

EIN INHIBITOR FÜR NEUTRALE
SERIN-PROTEINASEN
AUS LEUKOZYTEN VOM SCHWEIN:
ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG, CHEMISCHE
UND BIOLOGISCHE STUDIEN

Günter Trefz

Disbui. München

1988

EIN INHIBITOR FÜR NEUTRALE SERIN-PROTEINASEN
AUS LEUKOZYTEN VOM SCHWEIN:
ISOLIERUNG, CHARAKTERISIERUNG, CHEMISCHE
UND BIOLOGISCHE STUDIEN

DISSERTATION DER FAKULTÄT
FÜR CHEMIE UND PHARMAZIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

vorgelegt von
Günter Trefz
November 1987

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. R. Geiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 1988

1. Einleitung

2. Kindheit

3. Jugendjahre

4. Studium und Beruf

5. Familie

6. Reisen

Meinen Eltern

7. Die Eltern

8. Die Eltern

9. Die Eltern

10. Die Eltern

11. Die Eltern

12. Die Eltern

13. Die Eltern

14. Die Eltern

15. Die Eltern

16. Die Eltern

17. Die Eltern

18. Die Eltern

19. Die Eltern

20. Die Eltern

21. Die Eltern

22. Die Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Einleitung	7
3	Aufgabenstellung	15
4	Material und Methoden	16
4.1	Material	16
4.2	Methoden	21
4.2.1	Elektrophoresen	21
4.2.2	Isoelektrische Fokussierung	22
4.2.3	Aktivitätsbestimmung von Enzymen	23
4.2.3.1	Chymotrypsin und Cathepsin G	23
4.2.3.2	Trypsin	24
4.2.3.3	Pankreas-Elastase	25
4.2.3.4	Leukozyten-Elastase	25
4.2.3.5	Papain	26
4.2.3.6	Gewebe-Kallikrein	27
4.2.3.7	Plasma-Kallikrein	28
4.2.3.8	Lactatdehydrogenase	29
4.2.4	"Active site"-Titration von Enzymen	30
4.2.5	Hemmung der Enzymaktivitäten	31
4.2.5.1	Chymotrypsin und Cathepsin G	31

4.2.5.2	Trypsin	32
4.2.5.3	Pankreas-Elastase	33
4.2.5.4	Leukozyten-Elastasen	33
4.2.5.5	Papain	34
4.2.5.6	Gewebe-Kallikrein	35
4.2.5.7	Plasma-Kallikrein	36
4.2.6	Kinetische Untersuchungen	36
4.2.6.1	Hemmechanismus	36
4.2.6.2	Dissoziationskonstante K_1 nach Green und Work	37
4.2.6.3	Dissoziationskonstante K_1 nach Dixon.....	37
4.2.6.4	Assoziationskonstanten k_{on} der Reaktion von Chymotrypsin und Cathepsin G mit LNPI	37
4.2.6.5	Assoziationskonstanten k_{on} der Reaktion von Pankreas- und Leukozyten-Elastase mit LNPI	38
4.2.7	Synthese chromatographischer Träger	39
4.2.8	Chromatographische Verfahren	41
4.2.9	Aminosäureanalyse	42
4.2.10	Bestimmung freier SH-Gruppen	43
4.2.11	N-terminale Aminosäurebestimmung	44
4.2.12	Sequenzuntersuchungen	44
4.2.13	Proteinbestimmung	45
4.2.14	Immunologische Methoden	46
4.2.14.1	Gewinnung von Antiseren	46
4.2.14.2	Isolierung von Immunglobulin G aus Kanin- chen Serum	46
4.2.14.3	Immunelektrophorese	47

4.2.14.4	Elektroimmundiffusion nach Laurell (Rocket-Immunelektrophorese)	48
4.2.14.5	Titerbestimmungen	48
4.2.14.6	Western-Blot-Analyse	51
4.2.14.7	Konjugat-Synthesen	52
4.2.14.8	Enzymimmunoassay	55
4.2.14.9	Biolumineszenz-Enzymimmunoassay	56
4.2.15	Elektronenmikroskopische Lokalisation des Inhibitors	58
4.2.16	Pathobiochemische Untersuchungen am Schwein	59
5	Ergebnisse	61
5.1	Isolierung des Neutralen Proteinaseinhibitors aus Schweineleukozyten (LNPI)	61
5.1.1	Aufschluß der Leukozyten	61
5.1.2	Untersuchungen zur Hemmaktivität des Cytosols	62
5.1.3	Vorversuch zur Isolierung des LNPI	63
5.1.4	Reinigung des Inhibitors aus dem Leukozyten-Cytosol	63
5.2	Reinheitskriterien	67
5.3	Untersuchungen zur Primärstruktur von LNPI	68
5.4	Chemische und physikochemische Eigenschaften	69
5.5	Kinetische Untersuchungen	76
5.5.1	Untersuchungen zum Hemmechanismus	76
5.5.2	K_i -Werte	78
5.5.3	k_{on} -Werte	82



5.6	Weitere Untersuchungen zum Hemmmechanismus des LNPI	85
5.7	Immunologische Untersuchungen	89
5.7.1	Immunologische Charakterisierung des LNPI .	89
5.7.2	LNPI Enzymimmunoassay	94
5.7.3	LNPI Biolumineszenz Enzymimmunoassay	98
5.8	Elektronenmikroskopische Lokalisation des Inhibitors	102
5.9	Studien zur Pathobiochemie des LNPI	106
6	Diskussion	110
7	Ausblick	123
8	Literatur	124
Abkürzungen		135
Lebenslauf		138

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung eines Inhibitors für neutrale Serin-Proteinasen (LNPI) aus Schweine-Leukozyten.

Der Inhibitor konnte aus dem Leukozyten-Cytosol mittels Gelfiltration und "Fast protein liquid chromatography" (FPLC) 53fach angereichert werden. Durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und quantitative N-terminale Aminosäurebestimmung wurde die Reinheit der Inhibitorpräparation belegt. Die Aminosäurezusammensetzung des Inhibitors wurde ermittelt. Die N-terminale Aminosäure der Polypeptidkette ist blockiert. Erste Sequenzstudien zeigen Homologien zu Ovalbumin, Antithrombin III und zum menschlichen α_1 -Proteinaseinhibitor.

Unter reduzierenden Bedingungen konnte die Molekularmasse des LNPI in der SDS-PAGE zu 40 kDa bestimmt werden. Unter nicht reduzierenden Bedingungen kommt es zur Ausbildung höhermolekularer Aggregate. In der isoelektrischen Fokussierung trennt sich die Inhibitorpräparation in mehrere Proteinbanden auf, die auf unterschiedliche Glykosilierungsgrade der Polypeptidkette zurückzuführen sind.

Der Inhibitor hemmt die neutralen Serin-Proteinasen Elastase (aus Pankreas und PMN-Leukozyten), Chymotrypsin und Cathepsin G sehr gut. Die Hemmung dieser Enzyme durch LNPI wurde anhand kinetischen Parameter charakterisiert.

Antikörper gegen LNPI wurden in Kaninchen gewonnen und zur Ausarbeitung von Immunoassays (Enzymimmunoassay und Biolumineszenz-Enzymimmunoassay) für LNPI verwendet. Mittels Western-Blot-Analyse und Enzymimmunoassay

wurden Kreuzreaktionen gegenüber anderen Proteinen untersucht; eine schwache Kreuzreaktion konnte mit dem entsprechenden Inhibitor aus Rinder-Leukozyten gefunden werden. Mittels der immunologischen Bestimmungsmethoden wurde der Inhibitorgehalt in Schweine-Leukozyten gemessen. Elektronenmikroskopisch konnte LNPI in den Granulozyten lokalisiert werden.

In tierexperimentellen Studien (Sepsis beim Schwein) konnte mittels der entwickelten Immunoassays gezeigt werden, daß der LNPI-Spiegel im Plasma ein geeigneter Parameter zur Verlaufskontrolle einer Sepsis beim Schwein ist.

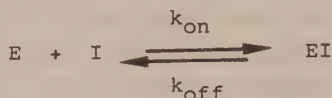
Proteolytische Systeme spielen in der Natur eine große Rolle. Sie kommen in Prokaryonten und Eukaryonten, Einzellern und Vielzellern, in der Tier- und in der Pflanzenwelt vor. Ihre Aufgabe erfüllen sie vor allem beim Abbau von Proteinen und bei der Regulation biologischer Prozesse (1). Man unterscheidet zwei Typen von Proteasen: die Proteinasen oder Endo-Proteasen (Spaltung endogener Peptidbindungen) und die Peptidasen oder Exo-Proteasen (Spaltung exogener Peptidbindungen). Die proteolytischen Enzyme werden je nach der Art der katalytisch wirksamen Aminosäure im aktiven Zentrum in Carboxyl-, Thiol- und Serin-Proteinasen unterteilt. Benötigen sie Metallionen, werden sie als Metallo-Proteasen bezeichnet.

Die Regulation der Proteasenaktivität erfolgt zum einen über die Aktivierung von inaktiven Zymogen-Vorstufen (Proenzyme), zum andern durch Inhibitoren (2).

In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Inhibitoren beschrieben, isoliert und charakterisiert. Ihre Aufgabe besteht darin, proteolytische Aktivitäten räumlich und zeitlich zu begrenzen und dadurch ungewollte proteolytische Prozesse zu verhindern.

Inhibitoren können Proteasen reversibel oder irreversibel hemmen. Im Falle einer **reversiblen Hemmung** kommt es zu einer Anlagerung des Inhibitors an das Enzym unter Ausbildung eines Enzym-Inhibitor-Komplexes, der unter bestimmten Reaktionsbedingungen wieder dissoziieren kann, wie dies zum Beispiel bei der Hemmung von Trypsin durch Aprotinin beobachtet wird (3).

Die reversible Hemmung kann vereinfacht durch folgendes Reaktionsschema beschrieben werden:



k_{on} ist dabei die Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion (Komplexbildung), k_{off} die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion (Komplexdissoziation).

Die Affinität eines reversiblen Inhibitors kann durch die Gleichgewichtskonstante K_i beschrieben werden:

$$K_i = \frac{k_{\text{off}}}{k_{\text{on}}}$$

Die Gleichgewichtskonstante K_i wird auch als Hemmkonstante bezeichnet.

In der klassischen Enzymkinetik kann man drei Formen der reversiblen Hemmung von Enzymen durch Inhibitoren unterscheiden (4): die kompetitive, die nicht-kompetitive und die unkompetitive Hemmung.

Im Falle der kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an das aktive Zentrum und verhindert dabei die Zugänglichkeit für das Substrat. Es kommt zu einer Verminderung der Katalysegeschwindigkeit durch Verringerung der Anzahl der Enzymmoleküle, die das Substrat umsetzen können.

Bei der nicht-kompetitiven Hemmung können Inhibitor und Substrat gleichzeitig vom selben Enzymmolekül an unterschiedliche Bindungsstellen angelagert werden; der Inhibitor bindet also nicht an das aktive Zentrum des Enzyms. Durch die Anlagerung des Inhibitors

kommt es zu einer Konformationsänderung des Enzyms wodurch die Bindung des Substrates an das aktive Zentrum erschwert wird.

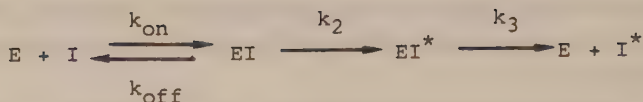
Bei der unkompetitiven Hemmung kann der Inhibitor nur an den Enzym-Substrat-Komplex binden, dessen weitere Umsetzung er dadurch verhindert.

Die drei Hemmechanismen lassen sich durch unterschiedliches Verhalten der kinetischen Parameter K_M , V_{max} , k_{cat} nach Inhibitorzugabe unterscheiden.

Unter einem **irreversiblen Inhibitor** versteht man einen Inhibitor, dessen Komplex mit der Protease nicht dissoziierbar ist. Drei Möglichkeiten kommen dafür in Betracht:

- 1) k_{off} ist so klein, daß eine Dissoziationsreaktion praktisch nicht stattfindet obwohl die Hemmung eigentlich reversibel ist, = pseudo-irreversibel,
- 2) es kommt zur Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen Inhibitor und Enzym,
- 3) der Inhibitor wird im Komplex mit der Proteinase durch Spaltung modifiziert und inaktiviert.

Eine Inaktivierung des Inhibitors durch Modifizierung während der Komplexbildung wurde bei der Hemmung von Trypsin, Chymotrypsin, Cathepsin G und Elastase durch den α_1 -Proteinase-Inhibitor beobachtet (5,6). Für den Hemmechanismus der Serin-Proteinasen durch den α_1 -Proteinase-Inhibitor wurde daher folgendes Schema vorgeschlagen (7, 8):



E: Enzym; I: Inhibitor; I*: modifiziertes, inaktives Inhibitorprotein; EI: Komplex zwischen Enzym und Inhibitor; EI*: Komplex zwischen Enzym und modifiziertem Inhibitorprotein; k_{on} : Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung; k_{off} : Geschwindigkeitskonstante der Komplexdissoziation; k_2 , k_3 : Geschwindigkeitskonstanten der irreversiblen Abbauschritte des Komplexes.

In einer ersten Gleichgewichtsreaktion bildet sich zwischen Enzym und Inhibitor ein Komplex aus, in dem es in einer nachfolgenden irreversiblen Reaktion zu einer Spaltung der "reactive site"-Bindung ($-\text{P}_1\text{!P}_1'-$) (7,9) des Inhibitors am aktiven Zentrum des Enzyms kommt. Die Dissoziation dieses Komplexes unter zumeist denaturierenden Bedingungen führt dann zu einem modifizierten, inaktiven Inhibitorprotein, dessen Molekülmasse durch die Abspaltung eines Peptids verringert ist.

Mit Ausnahme der Makroglobuline, die alle Typen von Proteinase hemmen, beschränkt sich das Wirkungsspektrum der einzelnen Inhibitoren in der Regel nur auf einen Proteinase-Typ. Die am besten untersuchten und charakterisierten Inhibitoren sind die Serinproteinase-Inhibitoren. Sie besitzen viele strukturelle Homologien unter anderem hinsichtlich der Aminosäuresequenzen, der Lage und Zahl der Disulfid-Brücken, der Lage und des Aufbaus der reaktiven Zentren. Entsprechend ihrem strukturellen Verwandtschaftsgrad können die Serin-Proteinaseinhibitoren in Inhibitor-Familien eingeteilt werden (7). Zu den am weitesten verbreiteten Familien zählen die Inhibitortypen nach Kunitz, Kazal und Bow-

man-Birk, sowie die Serpinfamilie (= α_1 -Proteinaseinhibitor-Familie).

Durch den Austausch einzelner Aminosäurereste in den reaktiven Zentren kann die Spezifität eines Inhibitors für eine bestimmte Serin-Proteinase unter Umständen drastisch verändert werden. So wird zum Beispiel der potente Trypsin-Inhibitor Aprotinin ($K_i = 6,0 \times 10^{-14}$ mol/l) (10) durch den Austausch von Lysin durch Valin in der Position 15 des Moleküls zu einem effektiven Elastase-Inhibitor ($K_i = 1,1 \times 10^{-10}$ mol/l) (10).

Humorale proteolytische Systeme

Durch die Verkopplung einzelner proteolytischer Systeme kommt es zur Ausbildung von sogenannten Proteinase-Kaskaden. Besonders wichtig sind die humoralen Kaskadensysteme des Blutplasmas: die Blutgerinnung (11), die Fibrinolyse (12), das Komplementsystem (13) und die Kallikrein-Kinin-Systeme (14). Sie zeichnen sich dadurch aus, daß eine Reihe von proteolytisch aktiven Faktoren kaskadenartig hintereinander geschaltet sind. Alle Proteasen besitzen eine hohe Substratspezifität. So wird zum Beispiel die Gerinnung durch spezifische Thrombokinase und die Fibrinolyse durch spezifische Plasminogenaktivatoren in Gang gesetzt. Die hohe Spezifität dieser Proteinase ist erforderlich, da beide Systeme, die Gerinnung und die Fibrinolyse, unabhängig und voneinander getrennt ablaufen müssen.

Diesen Proteinasen stehen eine Reihe von Inhibitoren im Blutplasma gegenüber, die für die Regulation der Protease-Aktivitäten verantwortlich sind (siehe Tab.1).

Inhibitor	M G $\times 10^{-3}$	mittl. Konzentration mg/100 ml	$\mu\text{mol/l}$
α_2 -Makroglobulin	725	260	3.6
α_1 -Proteinaseinhibitor	50	260	52
α_1 -Antichymotrypsin	70	45	6.4
β_1 -Collagenaseinh.	40	1.5	0.4
Inter- α -Trypsininhibitor	160	45	2.8
Antithrombin III	65	26	4.0
α_2 -Plasmininhibitor	70	6	0.9
C1-Inaktivator	100	24	2.4

Tab. 1 Proteinaseinhibitoren des menschlichen Plasmas.
(Molekülmasse (M.G.) und mittlere Konzentration
im Plasma (15)).

Eine überschießende Aktivierung der Gerinnung wird vor allem durch Antithrombin III verhindert. Die Fibrinolyse wird durch den α_2 -Plasmininhibitor und die Aktivierung des Komplement- und des Plasma-Kallikrein-Kinin-Systems durch C1-Inaktivator reguliert.

Zelluläre proteolytische Systeme

In den Lysosomen von Leukozyten, Makrophagen und Endothelzellen kommen Serin- und Thiol-Proteasen vor, die nur eine relativ geringe Substratspezifität aufweisen. Ihre Aufgabe besteht darin, intra- und extrazelluläre Proteine nach erfolgter Phagozytose abzubauen. Besonders wichtig sind hier die Proteasen Elastase und Cathepsin G (16, 17), die in hoher Konzentration in den Granula der PMN-Leukozyten vorkommen. Sie werden als "neutrale" Proteasen bezeichnet, da ihr Aktivitätsoptimum im physiologischen pH-Bereich liegt. Um die Protein-Faktoren

der Blutsysteme vor diesen intrazellulären, unspezifisch abbauenden Proteinasen zu schützen, sind im Blut-Plasma eine Reihe von Inhibitoren wie z.B. α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 PI), α_2 -Makroglobulin und α_1 -Antichymotrypsin vorhanden (9).

Das enorme Inhibitorpotential im Plasma für lysosomale Proteasen deutet auf eine hohe pathobiochemische Effektivität der lysosomalen Proteinasen hin. Tatsächlich kommt es im Verlauf schwerer endzündlicher Reaktionen (z.B. nach großen abdominal-chirurgischen Eingriffen, Polytraumata, pankreatogenem Schock etc.) zu einer Stimulierung, oft sogar zur Desintegration der PMN-Leukozyten. Dies bewirkt die extrazelluläre Freisetzung der normalerweise zellständigen lysosomalen Enzyme. Die im Plasma vorhandene Inhibitorkapazität reicht in manchen Fällen offensichtlich nicht aus, um die freigesetzten proteolytischen Aktivitäten zu hemmen. Dadurch kann es zum unspezifischen Abbau von humoralen Faktoren wie zum Beispiel Transportproteinen und Immunglobulinen kommen. Andererseits können auch biologisch aktive Peptide aus den Proteinen freigesetzt werden, die chemotaktisch wirksam sind und zur Einwanderung weiterer Leukozyten führen, die wiederum desintegrieren und dadurch das freigesetzte proteolytische Potential noch verstärken können. Freigesetzte Proteasen bewirken auch die Zerstörungen von Gewebe. Als Folge solcher unkontrollierten Prozesse kommt es zu entzündlichen Reaktionen wie zum Beispiel zu einer erhöhten Permeabilität der Blutgefäße, zur Ödembildung etc. (18).

Das Auftreten einer Sepsis ist nach wie vor eine der gefürchtetsten Komplikationen im postoperativen Verlauf sowie nach Polytraumata. Im Hinblick auf die frühzeitige Erkennung einer Sepsis wird zur Zeit noch nach eindeutigen diagnostischen Markern gesucht. PMN-Elastase, die bei der Degranulierung der PMN-Leukozyten freigesetzt

wird, wurde als ein solcher Marker vorgeschlagen (15). Sie wird im Plasma zum größten Teil durch α_1 Proteinase-inhibitor komplexiert. Dabei bildet sich ein stabiler Enzym-Inhibitor-Komplex aus, der mit Hilfe eines Enzym-immunoassays im Plasma von Patienten gemessen werden kann (19, 20). Unter Verwendung des Enzymimmunoassays konnte bei der Sepsis eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Menge an freigesetzter lysosomaler Elastase und dem Verbrauch von Plasmafaktoren beobachtet werden.

Unter normalen physiologischen Bedingungen werden die Plasmaproteine zum einen durch Kompartimentierung der neutralen Verdauungs-Proteasen in den Granula, zum anderen durch potente Inhibitoren im Plasma geschützt. Andererseits müssen auch die cytosolische Proteine der Granulozyten selbst vor diesen Verdauungs-Proteasen geschützt werden, falls diese unkontrolliert aus den Lysosomen freigesetzt werden. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren auch Inhibitoraktivitäten innerhalb der Zellen beschrieben. Kopitar und Lebez (21) untersuchten Schweine Leukozyten-Cytosol und fanden inhibitorische Aktivität gegen neutrale Proteinase. Dubin (22) isolierte einen Inhibitor aus dem Cytosol von Pferde-Leukozyten und beschrieb einige seiner Eigenschaften. Schließlich wurde auch ein Inhibitor im Cytosol menschlicher Leukozyten beschrieben, der Trypsin hemmt (23). Unklar ist allerdings noch, wie die Zelle es organisiert hat, daß einerseits der Schutz vor proteolytischer Aktivität gewährleistet wird und andererseits noch der intrazelluläre Abbau von Proteinen stattfinden kann.

Neben den Plasma-Inhibitoren wurden in den letzten Jahren auch zellständige Proteinase-Inhibitoren beschrieben (21-23). Nur wenige dieser zellulären Inhibitoren sind bisher jedoch näher charakterisiert worden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Serin-Proteinase-Inhibitor der PMN-Leukozyten des Schweins mit Hilfe proteinchemischer Methoden isoliert und mittels biochemischer, physikochemischer sowie immunologischer Methoden charakterisiert und lokalisiert werden.

Um einerseits die Funktion des intrazellulären Inhibitors verstehen zu lernen und andererseits seine mögliche Beteiligung während pathophysiologischer Zustände (z.B. der Sepsis des Schweins) zu erkennen, war auch beabsichtigt, Immunoassays (Enzymimmunoassay und Biolumineszenz Enzymimmunoassay) zum Nachweis des Inhibitors im Schweineblut auszuarbeiten.

4.1 Material

CNBr-aktivierte Sepharose 6 B, Protein A-Sepharose CL 4 B, Sephadex G-75 superfine, Dextran, N-Succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)-propionat (SPDP^R), PD-10 Säulen (G 25) und Mono S HR 5/5 waren Produkte der Firma Pharmacia Fine Chemicals, Upsalla, Schweden.

5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (Ellmann's Reagenz), Fast Garnett Salz, 2,2'-Azido-di-(3-ethylbenzthiazolinsulfonat) (ABTS^R), Serumalbumin vom Rind, Natriumperjodat, Cacodylsäure, Agarose Typ III, Medium EEO und Zymosan A wurden von der Firma Sigma, Taufkirchen geliefert.

Acrylamid, N,N-Methylenbisacrylamid, N,N,N',N',-Tetramethylethylenediamin, Ammoniumpersulfat, Ampholyte pH 2-11, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue, Brij 35 (Polyethylenmonolauryl ether), 4,4'-Dithiopyridin, Dansylhydrazin und Tween 20 wurden von der Firma Serva, Heidelberg bezogen.

Dithiothreitol, die Molekulargewichtsmarker-Proteine, Mercaptoethanol und das Ionenaustauscher-Harz AG 501-X8 wurden von der Firma Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA geliefert.

Die Marker-Proteine für die isoelektrische Fokussierung (pI 4,7 - 10,6) kamen von der Firma BDH Chemicals, Poole, England.

Glutardialdehyd und "Proteincolor" zur Silberfärbung von Proteinen im SDS-Gel wurden von der Firma Roth, Karlsruhe verwendet.

DEAE-Cellulose und Filterpapiere lieferte die Firma Whatmann, Maidstone, Kent, USA.

Pansorbin^R war ein Produkt der Firma Calbiochem, La Jolla, USA.

Für die Enzymimmunoassays wurden Mikrotiter-Platten der Firma Dynatech, Denkendorf verwendet.

Die Nitrocellulose Membranfilter BA 85 (0,45 μ m Porengröße) lieferte die Firma Schleicher und Schüll, Dassel. Der Immuno Gold Silver Stain Kit wurde von der Firma Janssen, Beerse, Belgien bezogen.

ATP war ein Produkt der Firma Boehringer, Mannheim.

Die für die Leukozyten-Isolierung benötigte 75 % Metrizoatlösung stammte von Nyegaard & Co, Oslo, Norwegen. Dimethylsulfoxid, Perjodsäure, Natriumborhydrid, Natriumdisulfit, Oktansäure, 30% H_2O_2 -Lösung, Glycerin und der LDH-Test Kit waren Produkte der Firma Merck, Darmstadt.

Endotoxin (Lipopolysaccharide B, E. coli 026-B6) war ein Produkt der Firma DIFCO Laboratories, Detroit, USA.

Alle weiteren Substanzen wurden als "p.a." oder biochemisch rein verwendet.

Enzyme

α -Chymotrypsin vom Rind (EC 3.4.21.1), Trypsin vom Schwein, TPCK-behandelt (EC 3.4.21.4), Pankreas-Elastase vom Schwein (EC 3.4.21.36) waren Produkte der Fa. Merck, Darmstadt.

Menschliches Cathepsin G wurde von S. Neumann, Merck, Darmstadt zur Verfügung gestellt.

Trypsin vom Rind (EC 3.4.21.4), TPCK-behandelt, war ein Produkt der Firma Worthington, Freehold, New Jersey, USA.

Von der Firma Boehringer, Mannheim stammten Papain aus Carica papaya (EC 3.4.22.2), Alkoholdehydrogenase aus Hefe (EC 1.1.1.1), Meerrettich-Peroxidase (EC 1.11.1.7) und Luciferase aus Photinus pyralis (EC 1.13.12.7).

Leukozyten-Elastase vom Schwein (EC 3.4.21.37) und humanes Gewebe-Kallikrein aus Harn (EC 3.4.21.35) wurden von R. Geiger, München, zur Verfügung gestellt; Humane Leukozyten-Elastase (EC 3.4.21.37) erhielten wir von M. Jochum, München.

Gewebe-Kallikrein aus Schweinepankreas (EC 3.4.21.35) war ein Geschenk von E. Truscheit, Bayer AG, Leverkusen. Plasma-Kallikrein vom Mensch (EC 3.4.21.34) wurde von der Firma Kabi, Mölndal, Schweden bezogen.

Alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) wurde von der Firma Sigma, Taufkirchen verwendet.

Substrate

Suc(Ala)₂ProPheNan, MeOSuc(Ala)₂ProValNan, MeOSuc(Ala)₂ProValAMC, AcPheArgOEt, BzArgNan und BzArgNA waren Produkte der Firma Novabiochem AG, Läufelfingen, Schweiz.

Suc(Ala)₂ProPheSBzl lieferte die Firma Bachem, Bubendorf, Schweiz.

DProPheArgNan wurde von der Firma Kabi, Mölndal, Schweden bezogen.

"Active site" Reagentien

2-Hydroxy-5-Nitrobenzylsulfonsäuresulten und 4-Nitrophenyl-4'-guanidinobenzoat-hydrochlorid waren Produkte der Fa. Serva, Heidelberg.

Inhibitoren

α_1 -Proteinase-Inhibitor vom Schwein wurde von R. Geiger, München, zur Verfügung gestellt.

LNPI vom Rind war eine Gabe von P. Hintz, Freiburg.

Phenylmethylsulfonylfluorid war ein Produkt der Firma Fluka, Buchs, Schweiz.

Die Firma Ciba Geigy AG, Basel, stellte rekombiniertes Eglin c zur Verfügung.

Immunologische Reagentien

Komplettes Freud'sches Adjuvans wurde von der Firma Behring, Marburg, verwendet.

Antiserum gegen α_1 -Proteinase-Inhibitor vom Schwein, anti-(Kaninchen-IgG) IgG von der Ziege und anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat wurden von R. Geiger, München, zur Verfügung gestellt.

anti-Kaninchen-Serum Immunglobulin G vom Esel wurde von der Firma Miles, Naperville, USA, bezogen.

Septische Schweineplasmen

Plasmen von septischen Schweinen wurden von M. Siebeck, München, bereit gestellt.

E. coli Suspensionen, die für die in vitro Stimulation der Leukozyten verwendet wurden, wurden von P. Scheuber, München, zur Verfügung gestellt.

Biologisches Ausgangsmaterial

Die Isolierung der Leukozyten erfolgte gemäß einer modifizierten Vorschrift nach Böyum (24). 10 Teile frisches Schweine-Citratblut (9 Teile Schweineblut + 1 Teil 3,8 % (w/v) Natriumcitratlösung) wurden mit 4 Teilen Isopaque-Dextranlösung (1 Teil 32,8% (v/v) Isopaqueelösung + 2 Teile 6% (w/v) Dextranlösung) unterschichtet. Innerhalb von 3-4 Stunden sedimentierten dabei bei Raumtemperatur die durch Dextran aggregierten Erythrozyten, während die Leukozyten über der durch die Isopaque gebildeten Grenzschicht blieben. Der leukozytenreiche Überstand wurde abgehoben und bei 400 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Sedimente in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen. Noch vorhandene Erythrozyten wurden durch hypotone Hämolyse zerstört. Dazu wurden die Sedimente (Volumen entspricht 1 Teil) mit 6 Teilen destilliertem Wasser versetzt. Unter Umschütteln wurden so die Erythrozyten lysiert. Nach 50 Sekunden wurden mit 3,6 % (w/v) NaCl-Lösung (Volumen entspricht 3 Teile) wieder isotone Verhältnisse hergestellt. Danach wurden die Leukozyten bei 200 g abzentrifugiert und wiederum in 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen. Nach einer zweiten hypotonen Hämolyse wurden die Leukozyten durch Zentrifugation bei 350 g erhalten. Sie wurden in Saccharose-Lösung (0,25 mol/l Saccharose, 0,05 mol/l Tris/HCl, 0,025 mol/l KCl, 0,005 mol/l $MgCl_2$, pH 7,4) aufgenommen.

4.2 Methoden

4.2.1 Elektrophoresen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Es wurden diskontinuierliche SDS-PAGEs in 10-20%igen Gradientengelen mit 5%igem Sammelgel nach Laemmli(25) auf Plattengelen durchgeführt. Unter reduzierenden Bedingungen enthielt der Probenpuffer 5 % (w/v) DTT. Die Proben wurden im Probenpuffer 5 Minuten bei 100°C vorinkubiert.

Proteinfärbung

Proteinbanden im Gel wurden durch Anfärbung mit Silber nach Oakley et al. (26) sichtbar gemacht.

Kohlenhydratfärbung

Die Anfärbung von Kohlehydraten im SDS-Gel erfolgte mit Dansylhydrazin nach Eckhardt et al. (27).

Lösungen:

Fixierlösung : 40 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure in dest. Wasser

Oxidationslösung : 0,7% (w/v) Perjodsäure in 5% (v/v) Essigsäure

Oxidations-Stop-Lösung : 0,5% (w/v) Natriumbisulfit in 5% (v/v) Essigsäure

Färbelösung : Saure DMSO-Lösung (0,015 ml konz. HCl auf 25 ml DMSO) mit frisch zubereiteter Dansylhydrazinlösung (50 mg in 25 ml DMSO) im Verhältnis 1 : 1 mischen

Reduktionslösung : 10 mg NaBH_4 / 50 ml DMSO

Entfärbelösung : 1% (v/v) Essigsäure

Durchführung:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in Fixierlösung gelegt. Die Oxidation der Kohlehydratanteile erfolgte in Oxidationslösung (2 Stunden unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur). Danach wurde das Gel mehrmals gründlich mit Wasser gewaschen. Durch Inkubation des Gels in Oxidations-Stop-Lösung konnte die überschüssige Perjodsäure zerstört werden (1 Stunde bei Raumtemperatur bis zur Farblosigkeit). Danach wurde wieder mit Wasser gewaschen. Die Anfärbung der oxidierten Kohlehydratanteile erfolgte 2 Stunden bei 60°C im Wasserbad in Färbelösung. Zur Konservierung der Anfärbung wurde das Gel noch in Reduktionslösung inkubiert (1 Stunde bei Raumtemperatur). Es wurde solange mit Entfärbelösung entfärbt, bis die Hintergrundfärbung verschwunden und Banden gut zu erkennen waren. Zum Sichtbarmachen der Banden diente eine UV-Lampe (366 nm).

4.2.2 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde in ultradünnen Polyacrylamid-Gelen nach Görg et al. (28) unter Verwendung von Servalyt, pH 2-11, durchgeführt. Dabei wurden Harnstoff-haltige Gele verwendet. Die Anfärbung der Proteine in den Gelen erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue.

4.2.3 Aktivitätsbestimmung von Enzymen

4.2.3.1 Chymotrypsin- und Cathepsin G Test (29,30)

Die Messung der Chymotrypsin-Aktivität erfolgte mit dem Substrat $\text{Suc(Ala)}_2\text{ProPheNan}$, aus dem Nitroanilin (Nan) freigesetzt wird, das photometrisch bei 405 nm bestimmt werden kann.

Testansatz (25°C, 405 nm):

0,63 ml Testpuffer (0,1 mol/l Tris/HCl, 0,01 mol/l CaCl_2 ; 0,05 % (w/v) Triton X 100, pH 7,8)
0,02 ml Enzymlösung

5 Min bei 25°C inkubieren

0,05 ml $\text{Suc(Ala)}_2\text{ProPheNan}$ -Lsg. (14 mmol/l DMSO)

Berechnung der Enzymaktivität

($\epsilon = 10\,200 \text{ l/mol} \times \text{cm} (30))$:

$(\text{mU/ml}) = 3431 \times \Delta E/\text{min}$

Die Bestimmung der Cathepsin G-Aktivität erfolgte analog der oben beschriebenen Chymotrypsin-Bestimmung.

4.2.3.2 Trypsin (31,32)

Die Bestimmung der Trypsin-Aktivität erfolgte mit dem Substrat BzArgNan, aus dem Nitroanilin (Nan) freigesetzt wird, das photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann.

Testansatz (25°C, 405 nm)

0,93 ml Testpuffer (0,02 mol/l Triethanolamin/HCl,
0,02 mol/l CaCl₂, pH 7,8)
0,05 ml Enzymlösung

5 Minuten bei 25 °C inkubieren

0,02 ml BzArgNan-Lösung (38,4 mmol/l in DMSO)

Berechnung der Enzymaktivität

($\epsilon = 10\,200\text{ l/mol} \times \text{cm}$ (32)):

$(\text{mU/ml}) = 1961 \times \Delta E/\text{min}$

4.2.3.3 Pankreas-Elastase (33,34)

Die Messung der Pankreas-Elastase-Aktivität erfolgte mit dem Substrat MeOSuc(Ala)₂ProValNan, aus dem Nitroanilin (Nan) freigesetzt wird, das photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann.

Testansatz (25°C, 405 nm)

0,91 ml Testpuffer (0,1 mol/l Tris/HCl, 0,5 mol/l NaCl, 0,05 % (w/v) Triton X 100, pH 7,5)

0,04 ml Enzymlösung

5 Minuten bei 25 °C inkubieren

0,05 ml MeOSuc(Ala)₂ProValNan-Lsg. (40 mmol/l DMSO)

Berechnung der Enzymaktivität

($\epsilon = 10\,200 \text{ l/mol} \times \text{cm}$ (33)):

(mU/ml) = $2450 \times \Delta E/\text{min}$

4.2.3.4 Leukozyten-Elastase

Die Bestimmung der Aktivität von menschlicher und Schweine-Leukozyten-Elastase erfolgte mittels MeOSuc-(Ala)₂ProValNan als Substrat wie unter 4.2.3.3 beschrieben.

4.2.3.5 Papain (35)

Die Bestimmung der Papain-Aktivität wurde mit dem Substrat BzArgNA durchgeführt, aus dem Naphtylamin (NA) freigesetzt wird, das nach Diazotierung mit Fast-Garnett Salz bei 509 nm photometrisch gemessen wird.

Testansatz (37°C, 509 nm)

0,100 ml Enzymlösung
0,275 ml Aktivatorlösung (5 mmol/l Cystein, 0,1 mol/l NaH_2PO_4 , 1,5 mmol/l EDTA, pH 6,0)

5 Minuten bei 37°C inkubieren

0,025 ml BzArgNA-Lösung (0,1 mol/l DMSO)

10 Minuten bei 37°C inkubieren

1,000 ml Stop-Lösung (1 Volumenteil 10 mmol/lp-Chlorbenzoesäure, 50 mmol/l EDTA, pH 6,0 + 1 Volumenteil Fast-Garnett- Salz-Lsg. (0,025 mg/ml 4 % (v/v) Brij 35))

Nach 10 Minuten Extinktion bei 509 nm messen.

Berechnung der Enzymaktivität

($\epsilon = 24\,000 \text{ l/mol} \times \text{cm (35)}$):

(mU/ml) = $582,4 \times \Delta E/\text{min}$

4.2.3.6 Gewebe-Kallikrein (36,37)

Die Bestimmung der Gewebe-Kallikreinaktivität wurde mit AcPheArgOEt durchgeführt. Dabei wird Ethanol freigesetzt das anschließend enzymatisch mit ADH bestimmt werden kann.

Testansatz (25°C, 366 nm)

1,00	ml	Testpuffer (75 mmol/l Na-Pyrophosphat, 75 mmol/l Semicarbazid, 22,5 mmol/l Glycin, pH 8,7)
0,34	ml	bidest. Wasser
0,05	ml	NAD-Lösung (30 mmol/l)
0,01	ml	ADH-Suspension (ca. 300 U/mg)
0,05	ml	Enzymlösung

5 Minuten bei 25°C inkubieren

0,05	ml	AcPheArgOEt-Lösung (15 mmol/l H ₂ O)
------	----	---

2 Minuten vorinkubieren und dann Zunahme der Extinktion bei 366 nm messen.

Berechnung der Enzymaktivität

(ϵ = 33 00 l/mol x cm (36)):

(mU/ml) = 9090 x ΔE /min

4.2.3.7 Plasma-Kallikrein (38)

Die Bestimmung der Plasma-Kallikreinaktivität erfolgte mit DProPheArgNan, aus dem Nitroanilin (Nan) freigesetzt wird, das photometrisch bei 405 nm gemessen werden kann.

Testansatz (37°C, 405 nm):

0,88 ml Testpuffer (0,05 mol/l Tris/HCl,
0,012 mol/l NaCl, pH 7,8)
0,02 ml Enzymlösung

5 Minuten bei 37°C inkubieren

0,10 ml DProPheArgNan-Lösung (6 mmol/l)

Berechnung der Enzymaktivität

($\epsilon = 10\,200 \text{ l/mol} \times \text{cm (38)}$):

$(\text{mU/ml}) = 4900 \times \Delta E/\text{min}$

4.2.3.8 Lactatdehydrogenase

Die Bestimmung der Lactat-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte durch Reduktion von Pyruvat zu Lactat. Für die Reduktion wird NADH benötigt, dessen Abnahme im Verlauf der Reaktion bei 334 nm photometrisch bestimmt werden kann. Es wurde ein gebrauchsfertiger Reagentiensatz der Firma Merck eingesetzt (Merck-1-Test, Nr. 3349 LDH).

Testansatz (25°C, 334 nm):

0,50 ml Reaktionslösung (0,6 mmol/l Natriumpyruvat,
0,18 mmol/l NADH, 50 mmol/l Phosphatpuffer,
pH 7,5)
0,01 ml Enzymlösung bzw. Probe

Mischen und nach 1 Minute die Extinktionsabnahme pro Minute bestimmen.

Berechnung der Enzymaktivität:

($\epsilon = 6230 \text{ cm}^2/\text{mol}$)

(mU/ml) = $8252 \times \Delta E/\text{min}$

4.2.4 "Active site"-Titration von Enzymen

Die "Active site"-Titration von α -Chymotrypsin erfolgte bei 25°C nach Kezdy und Kaiser (39) mit 2-Hydroxy-5-nitrobenzylsulfonsäuresulten durch Messen der Extinktionsänderung bei 390 nm. Die Enzym-Titration wurde bei zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration erfolgte graphisch (39).

Die "Active site"-Titration von Trypsin erfolgte bei 25°C nach Chase und Shaw (40) mit NPGB durch Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm. Die Enzymtitration wurde mit zwei verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Die Bestimmung der aktiven Enzymkonzentration erfolgte graphisch (40).

Die "Active site"-Titration der Elastasen und des Cathepsin G wurde mit Eglin c (41) durchgeführt. Die Testansätze zur Hemmung von Elastasen und Cathepsin G mit Eglin c sind in 4.2.5 beschrieben. Dazu wurde Eglin c zunächst mit einer durch "Active site" Titration standardisierten α -Chymotrypsin-Lösung titriert. Unter Berücksichtigung der Ausbildung eines 1 : 1 Komplexes zwischen α -Chymotrypsin und Eglin c konnte so die molare Konzentration des aktiven Eglins bestimmt werden. Mit dieser standardisierten Eglin c - Lösung wurde dann die molaren Konzentrationen der aktiven Elastasen bestimmt werden, da diese auch einen äquimolaren Komplex mit Eglin bilden (41).

Cathepsin G wurde analog dazu titriert.

4.2.5 Hemmung der Enzymaktivitäten

4.2.5.1 Chymotrypsin und Cathepsin G

Die Hemmung von Chymotrypsin und Cathepsin G durch LNPI wurde mittels des in 4.2.4.1 beschriebenen Suc(Ala)₂Pro-PheNan-Tests durchgeführt. Der Ansatz wurde wie folgt verändert:

Testansatz

(0,63 - x)	ml	Testpuffer
0,02	ml	Enzymlösung
x	ml	Inhibitorlösung ($x \leq 0,10$ ml)

15 Minuten bei 25°C inkubieren

0,05	ml	Substratlösung
------	----	----------------

Berechnung der Inhibitoraktivität:

$$(\text{mIU/ml}) = (0,0686/x) \times (\Delta E_0/\text{min} - \Delta E_i/\text{min})$$

(x = eingesetzte Menge an Inhibitor-Lsg. in Liter,

$\Delta E_0/\text{min}$ = Enzymaktivität ohne Inhibitor,

$\Delta E_i/\text{min}$ = Enzymaktivität mit Inhibitor)

4.2.5.2 Trypsin

Die Hemmung von Trypsin durch LNPI wurde mit dem in 4.2.3.2 beschriebenen BzArgNan-Test untersucht. Der Test wurde wie folgt erweitert:

Testansatz

(0,93 - x)	ml	Testpuffer
0,05	ml	Enzymlösung
x	ml	Inhibitorlösung ($x \leq 0,10$ ml)

15 Minuten bei 25°C inkubieren

0,02	ml	Substratlösung
------	----	----------------

Berechnung der Inhibitoraktivität:

$$(\text{mIU/ml}) = (0,098/x) \times (\Delta E_0/\text{min} - \Delta E_i/\text{min})$$

(x = eingesetzte Menge an Inhibitor-Lsg. in Liter,
 $\Delta E_0/\text{min}$ = Enzymaktivität ohne Inhibitor,
 $\Delta E_i/\text{min}$ = Enzymaktivität mit Inhibitor)

4.2.5.3 Pankreas-Elastase

Die Messung der Hemmung von Schweine-Pankreas-Elastase durch LNPI erfolgte unter Abänderung des in 4.2.3.3 beschriebenen MeSuc(Ala)₂ProValNan-Tests.

Testansatz

(0,91 - x) ml	Testpuffer
0,04 ml	Enzymlösung
x ml	Inhibitorlösung ($x \leq 0,10$ ml)

15 Minuten bei 25°C inkubieren

0,05 ml	Substratlösung
---------	----------------

Berechnung der Hemmaktivität:

$$(\text{mIU/ml}) = (0,098/x) \times (\Delta E_0/\text{min} - \Delta E_i/\text{min})$$

(x = eingesetzte Menge an Inhibitor-Lsg. in Liter,

$\Delta E_0/\text{min}$ = Enzymaktivität ohne Inhibitor,

$\Delta E_i/\text{min}$ = Enzymaktivität mit Inhibitor)

4.2.5.4 Leukozyten-Elastasen

Die Untersuchung der Hemmung der Leukozyten-Elastasen durch LNPI erfolgte in Analogie der bei Pankreas-Elastase beschriebenen Vorschrift (vgl. 4.2.5.3).

4.2.5.5 Papain

Die Hemmung von Papain durch LNPI wurde mittels des in 4.2.3.5 beschriebenen Tests durchgeführt. Der Test wurde wie folgt verändert:

Testansatz

(0,275 - x)	ml	Aktivatorlösung
0,100	ml	Enzymlösung
x	ml	Inhibitorlösung ($x \leq 0,05$ ml)

15 Minuten bei 37°C inkubieren

0,025	ml	Substratlösung
-------	----	----------------

10 Minuten bei 37°C inkubieren

1,000	ml	Stopplösung
-------	----	-------------

Nach 10 Minuten Extinktion bei 509 nm messen.

Berechnung der Hemmaktivität:

$$(\text{mIU/ml}) = (0,0582/x) \times (\Delta E_0/\text{min} - \Delta E_1/\text{min})$$

(x = eingesetzte Menge an Inhibitor-Lsg. in Liter,

$\Delta E_0/\text{min}$ = Enzymaktivität ohne Inhibitor,

$\Delta E_1/\text{min}$ = Enzymaktivität mit Inhibitor)

4.2.5.6 Gewebe-Kallikrein

Die Hemmung von Gewebe-Kallikrein durch LNPI wurde mit Hilfe des in 4.2.3.6 beschriebenen Tests untersucht. Der Test wurde wie folgt abgeändert:

Testansatz

1,00	ml	Testpuffer
0,05	ml	Enzymlösung
(0,34 - x)	ml	bidest. Wasser
x	ml	Inhibitorlösung ($x \leq 0,10$ ml)

15 Minuten bei 25°C inkubieren

0,01	ml	ADH-Suspension
0,05	ml	NAD-Lösung

5 Minuten bei 25°C inkubieren

0,05	ml	Substratlösung
------	----	----------------

2 Minuten inkubieren und Zunahme der Extinktion bei 366 nm messen.

Berechnung der Hemmaktivität:

$$(\text{mIU/ml}) = (0,4545/x) \times (\Delta E_0/\text{min} - \Delta E_1/\text{min})$$

(x = eingesetzte Menge an Inhibitor-Lsg. in Liter,

$\Delta E_0/\text{min}$ = Enzymaktivität ohne Inhibitor,

$\Delta E_1/\text{min}$ = Enzymaktivität mit Inhibitor)

4.2.5.7 Plasma-Kallikrein

Die Hemmung von Plasma-Kallikrein durch LNPI wurde mittels des in 4.2.3.7 Tests durchgeführt. Der Test wurde dazu folgendermaßen abgeändert:

Testansatz

(0,88 - x)	ml	Testpuffer
0,02	ml	Enzymlösung
x	ml	Inhibitorlösung ($x \leq 0,10$ ml)

15 Minuten bei 37°C inkubieren

0,10	ml	Substratlösung
------	----	----------------

Berechnung der Hemmaktivität:

$$(\text{mIU/ml}) = (0,098/x) \times (\Delta E_0/\text{min} - \Delta E_i/\text{min})$$

(x = eingesetzte Menge an Inhibitor-Lsg. in Liter,
 $\Delta E_0/\text{min}$ = Enzymaktivität ohne Inhibitor,
 $\Delta E_i/\text{min}$ = Enzymaktivität mit Inhibitor)

4.2.6 Kinetische Untersuchungen

4.2.6.1 Hemmechanismus

Eine konstante Menge Enzym wurde mit einer konstanten Menge Inhibitor inkubiert. Die verbleibende Enzymaktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Die graphische Auswertung erfolgte nach Lineweaver und Burk (42).

4.2.6.2 Dissoziationskonstanten K_i nach Green und Work (43)

Die Hemmkurven wurden nach Titration der Enzyme mit den entsprechenden Inhibitorkonzentrationen graphisch dargestellt. Nach Ermittlung des Äquivalenzpunktes wurden die K_i -Werte rechnerisch bestimmt.

4.2.6.3 Dissoziationskonstanten K_i nach Dixon (44)

Zur Bestimmung der Inhibitionskonstanten K_i nach Dixon wurde eine konstante Menge Enzym mit steigenden Mengen Inhibitor inkubiert. Die verbleibende Enzymaktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels PC Computer Olivetti M 24 unter Verwendung eines Kinetik-Programmes (45).

4.2.6.4 Assoziationskonstanten k_{on} der Reaktion von Chymotrypsin oder Cathepsin G mit LNPI

Die Bestimmung von k_{on} erfolgte mit $\text{Suc(Ala)}_2\text{ProPheSBzl}$ (46), aus dem Thiophenol freigesetzt wird, das nach Kopplung mit Ellmann's Reagenz bei 405 nm photometrisch gemessen werden kann. Zur Ermittlung von k_{on} müssen äquimolare Mengen an Enzym und Inhibitor eingesetzt werden.

Testansatz (25°C, 405 nm)

0,94 ml	Testpuffer (0,1 mol/l Tris, 0,01 mol/l CaCl_2 , 0,05 % (w/v) Triton X 100, pH 7,8)
0,02 ml	Enzymlösung
0,02 ml	Ellmann's Reagenz (12 mmol/l in DMSO)

5 Minuten bei 25 °C inkubieren und Küvette auf Null abgleichen.

0,02 ml	Inhibitorlösung
---------	-----------------

x Minuten bei 25 °C inkubieren ($x < 15$ min)

0,02 ml	Suc(Ala) ₂ PropheSBzl-Lösung (2 mmol/l in DMSO)
---------	--

Die Assoziations-Konstante k_{on} wurde graphisch bestimmt.

Die Assoziations-Konstante für menschliches Cathepsin G wurde nach der gleichen Vorschrift ermittelt.

4.2.6.5 Assoziationskonstanten k_{on} der Reaktion von Pankreas- und Leukozyten-Elastase mit LNPI

Zur Bestimmung von k_{on} wurde ein Test mit MeOSuc(Ala)₂-ProValAMC durchgeführt, aus dem 7-Amino-4-methyl-coumarin freigesetzt wird, das fluorimetrisch gemessen werden kann (33). Zur Bestimmung von k_{on} müssen äquimolare Mengen an Enzym und Inhibitor eingesetzt werden.

Testansatz (25°C, λ_{ex} = 370 nm, λ_{em} = 460 nm)

0,94 ml Testpuffer (0,1 mol/l Tris/HCl, 0,5 mol/l
NaCl, 0,05 % (w/v) Triton X 100, pH 7,5)
0,04 ml Enzymlösung

5 Minuten bei 25 °C inkubieren und Küvette auf Null
abgleichen

0,02 ml Inhibitorlösung

x Minuten bei 25 °C inkubieren ($x \leq 5$ min)

0,02 ml MeOSuc(Ala)₂ProValAMC-Lösung (25 mmol/l in
DMSO)

Bestimmung der Änderung der relativen Fluoreszenz-Ein-
heiten pro Minute ($\Delta RFU/min$).

Nach dieser Testvorschrift wurden die k_{on} -Werte der
Hemmung von Schweine-Pankreas- und-Leukozyten-Elastase
sowie von humaner Leukozyten-Elastase ermittelt.

4.2.7 Synthese chromatographischer Träger

Durch Kopplung verschiedener Liganden an CNBr-aktivierte
Sepharose wurden chromatographische Träger für Affini-
tätschromatographien synthetisiert. Folgende Liganden
wurden verwendet:

α -Chymotrypsin vom Rind, Anhydrochymotrypsin, Leukozy-
ten-Elastase vom Schwein und LNPI.

Herstellung von Anhydrochymotrypsin (47,48)

5 mg α -Chymotrypsin wurden in 5 ml 0,1 mol/l Tris/HCl pH 8,0, enthält 0,1 mol/l NaCl, 0,12 mol/l CaCl_2 und 13 % (v/v) Methanol, gelöst. Zu dieser Lösung wurden siebenmal 0,1 ml Aliquote Phenylmethylsulfonylfluorid (7 mg/ml in Aceton) unter Rühren zugegeben, wobei jeweils die Abnahme der Chymotrypsinaktivität bestimmt wurde. Nachdem die Aktivität unter 1 % gesunken war, wurde die Lösung über Nacht bei 4°C gegen 1 mmol/l HCl dialysiert. Das entstandene Phenylmethylsulfonyl-Chymotrypsin wurde in 10 ml eiskalter 0,1 mol/l KOH gelöst und eine Stunde im Eisbad inkubiert. Danach wurde der pH-Wert der Lösung auf pH 3,0 mit 6 mol/l HCl eingestellt. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4°C gegen 1 mmol/l HCl dialysiert und anschließend lyophilisiert. Anhydrochymotrypsin wurde als weißes Pulver erhalten.

Allgemeine Vorschrift zur Synthese von affinitätschromatischen Trägern

5 g CNBr-aktivierte Sepharose wurden in 50 ml 1 mmol/l HCl 15 Minuten bei Raumtemperatur gequollen. Anschließend wurde mit 300 ml 1 mmol/l HCl und 20 ml Wasser gewaschen. Das gewaschene Gel wurde in 1 Volumenteil Carbonat-Puffer (1 mol/l NaHCO_3 , 0,5 mol/l NaCl, pH 8,3) suspendiert. Der zu koppelnde Ligand (Chymotrypsin-Anhydrochymotrypsin, Schweine-Leukozyten-Elastase, LNPI) wurde in 2 Volumenteilen des Carbonat-Puffers aufgenommen und zur Gel-Suspension gegeben. Der Ansatz wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur "end over end" rotiert. Man wusch das Gel anschließend mit 300 ml Carbonat-Puffer, suspendierte es in 3 Volumenteilen 0,2 mol/l Glycin, pH 8,0 und inkubierte 2 Stunden bei Raumtemperatur unter "end over end" Rotation. Danach wurde das Gel zweimal

mit je 50 ml Carbonatpuffer, pH 8,3, und 0,1 mol/l Essigsäure, 0,5 mol/l NaCl pH 4,0 und anschließend wieder mit Carbonatpuffer gewaschen. Das Gel wurde in 50 mmol/l Tris/HCl, 1 mol/l NaCl, 0,2 g/l NaN_3 , pH 7,4 suspendiert.

4.2.8 Chromatographische Verfahren

Gelfiltration (Sephadex G-75 superfine und PD 10 Säulen) wurden nach bekannten Vorschriften der Firma Pharmacia (vgl. Firmenbroschüre "Gel filtration theory and practice") durchgeführt.

Ionenaustausch-Chromatographien wurden mit einem FPLC-System der Firma Pharmacia durchgeführt:

FPLC-System Nr.1

Säule : Mono S HR 5/5
 Puffer A : 0,05 mol/l Natriumacetat, pH 5,0
 Puffer B : 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,5
 Fluß : 1,5 ml/min
 Wellenlänge : 280 nm
 Gradientenprogramm:

Zeit (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	100	0
10	100	0
15	55	45
25	50	50
40	40	60
45	0	100
50	0	100
50	100	0
70	100	0

FPLC-System Nr.2

Säule : Mono S HR 5/5
Puffer A : 0,05 mol/l Natriumacetat, pH 5,40
Puffer B : 0,05 mol/l Natriumacetat, pH 5,65
Fluß : 1,5 ml/min
Wellenlänge : 280 nm
Gradientenprogramm:

Zeit (min)	% Puffer A	% Puffer B
0	100	0
10	100	0
25	0	100
30	0	100
50	0	100

4.2.9 Aminosäureanalyse

Zu analysierende Proteine (ca. 2 nmol) wurden gegen Wasser dialysiert und dann lyophilisiert. Die Lyophilisate wurden in 0,02 ml dest. Wasser (Millipor-gefiltert) gelöst und in Hydrolyseröhrchen eingewogen. Nach Trocknen der Proben wurden jeweils 0,20 ml Hydrolysesäure (6 mol/l phenolische HCl (0,1 % (v/v) Phenol) dazu gegeben und 24 h bei 110°C unter Vakuum inkubiert. Die Analyse der über NaOH getrockneten Hydrolysate erfolgte an einem Biotronic LC 5000 Analysator. Cystein wurde als Cysteinsäure nach Perameisensäureoxidation (49) bestimmt.

4.2.10 Bestimmung freier SH-Gruppen

Die Bestimmung der freien SH-Gruppen erfolgte nach Grassetti (50) mit 4,4'-Dithiopyridin.

Lösungen:

Puffer (Krebs-Ringer-Stammlösung): 0,11 mol/l NaCl, 4,7 mmol/l KCl, 2,5 mmol/l CaCl_2 , 1,1 mmol/l KH_2PO_4 , 1,0 mmol/l MgSO_4 , 25,7 mmol/l NaHCO_3 , pH 7,2.

Grassetti-Reagenz: 0,44 mg 4,4'-Dithiopyridin/ml Puffer.

Testansatz (25°C, 324 nm)

0,10 ml	Proteinlösung
0,50 ml	Puffer
0,40 ml	Grassetti-Reagenz

Messen bis die Extinktion konstant ist (ca. 15 Minuten bei 25°C).

Die Probe wurde gegen einen Leerwert (Puffer anstelle von Proteinlösung) gemessen.

Berechnung des SH-Gruppen-Gehalts:

$c = E \times f$ (mol/l); ($f = 5,05 \times 10^{-5}$ mol/l (50)).

Mittels Bestimmung der Molarität der Proteinlösung kann der Gehalt an SH-Gruppen pro Molekül errechnet werden.

Reduktion der S-S-Brücken mit Natriumborhydrid (51):

Die gegen Wasser dialysierten und lyophilisierten Proteinproben wurden in 0,05 ml 0,02 % (w/v) EDTA-Lösung, pH 8,5, gelöst.

Dazu wurden 0,05 ml NaBH_4 -Lösung (0,2 mol/l) gegeben. Nach Begasen mit Stickstoff wurde die Reaktionsmischung 1 Stunde im Eisbad inkubiert. Danach wurde das überschüssige NaBH_4 durch Ansäuern mit 2 mol/l HCl zerstört. Die freien SH-Gruppen wurden wie oben beschrieben nach Grassetti bestimmt.

4.2.11 N-terminale Aminosäurebestimmung

Die N-terminale Aminosäure wurde durch Edmann-Abbau (52) bestimmt. Die Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden mit Hilfe eines isokratischen HPLC-Systems (53) identifiziert.

4.2.12 Sequenzuntersuchungen

Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz wurde LNPI nach Reduktion und Carboxymethylierung der SH-Gruppen mittels CNBr-Spaltung fragmentiert.

Reduktion und Carboxymethylierung (54)

0,5 mg LNPI wurden in 0,5 ml 6 mol/l Guanidiniumhydrochlorid, 0,2 mol/l Essigsäure, 0,1 mol/l Tris, 5 mmol/l EDTA, pH 4,7, gelöst, mit N_2 begast und durch Zugabe von 0,02 ml Mercaptoethanol 20 Stunden bei 40°C reduziert. Zur Alkylierung wurden 0,06 g Iodessigsäure in 0,5 ml 6 mol/l Guanidiniumhydrochlorid, 2 mol/l Tris, pH 9,0, zugegeben. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,025 ml Mercaptoethanol gestoppt. Der Reaktionsansatz wurde durch Zugabe von Ameisensäure auf pH 2,0 gebracht und sofort über eine gegen 0,04 % (v/v) Trifluoressigsäure äquilibrierte Sephadex PD 10-Säule entsalzt.

CNBr-Spaltung

Das S-Carboxymethylierte Protein wurde in 0,2 ml 70 % (v/v) Ameisensäure gelöst, das gleiche Volumen an 20 % CNBr-Lösung wurde zugegeben und nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur und Lichtausschluß wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeengt. Der Rückstand wurde zweimal mit Wasser gewaschen. Die Spaltprodukte wurden in wenig 0,1 % (w/v) Trifluoracetat in Wasser aufgenommen und mit Hilfe eines reversed-phase HPLC-Systems (Vydac TP-Säule) (55) aufgetrennt.

Erhaltene Fragmente wurden mittels eines Gasphasen-Sequenzators sequenziert. Die Bestimmung der Phenylthiohydantoin-Aminosäuren erfolgte mittels eines isokratischen HPLC-Systems (53).

4.2.13 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen wurden nach Bradford (56) (Rinderserumalbumin diente als Proteinstandard), mittels Aminosäureanalyse (vgl. 4.2.9) und durch Messung der Extinktion bei 280 nm durchgeführt.

4.2.14 Immunologische Methoden

4.2.14.1 Gewinnung von Antiseren

1 ml LNPI-Lösung (0,09 mg/ml 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,5) wurden mit 0,5 ml kompletten Freud'schem Adjuvans emulgiert. Diese Emulsion wurde zwei Neuseeländer-Kaninchen intracutan injiziert (0,10 mg LNPI pro Tier). Zwei Wochen nach der Grundimmunisierung wurden wöchentlich intravenöse Booster-Injektionen gegeben (0,10 mg LNPI in 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,5 pro Tier). Der Antikörpertiter wurde wöchentlich mittels Enzymimmunoassays kontrolliert. Nach Erreichen eines konstanten Titers wurden die Tiere entblutet und die Seren gewonnen.

4.2.14.2 Isolierung von Immunglobulin G aus Kaninchenserum

Isolierung mittels Oktansäure-Fällung

Die Isolierung der Gesamt-IgG-Fraktion wurde nach Steinbuch (57) durchgeführt.

Immunselektion von Kaninchen IgG

Die Isolierung spezifischer Antikörper gegen LNPI aus Kaninchenserum erfolgte durch Affinitätschromatographie unter Verwendung einer LNPI-Sepharose-Säule (Säulenvolumen: 2 ml). Das Antiserum wurde auf die gegen PBS-Puffer (137 mmol/l NaCl, 2,7 mmol/l KCl, 6,5 mmol/l Na₂HPO₄, 1,5 mmol/l KH₂PO₄, 3,0 mmol/l NaN₃, pH 7,2) äquilibrierte Säule aufgetragen und zyklisch über Nacht bei 4°C gepumpt (Fluß: 10 ml/h). Nicht gebundene Proteine wurden anschließend mit PBS-Puffer eluiert. Danach wurde mit 0,2 mol/l Natriumthiocyanat gespült. Die Elution der

gebundenen Antikörper erfolgte mit Glycin/HCl-Puffer (0,2 mol/l Glycin/HCl, pH 2,2). Zur raschen Neutralisierung des pH-Wertes wurden in die Fraktionsgefäße 1,15 mol/l HEPES-Puffer pH 7,5 vorgelegt, wodurch der pH auf 4,5 angehoben wurde. Die erhaltenen Antikörper wurden über Nacht bei 4°C gegen PBS-Puffer dialysiert. Die Konzentrierung des Dialysats erfolgte durch Vakuum-Dialyse. Durch Messen von E_{280} wurde die Ausbeute bestimmt. Die IgG-Lösung wurde abzentrifugiert, der Überstand in Eppendorf-Gefäße portioniert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Unter diesen Bedingungen waren die Antikörper mindestens ein Jahr haltbar.

Charakterisierung der Antiseren und der IgG-Fraktion:

Die Antiseren wurden durch ihren Antikörpertiter (Definition und Bestimmung vgl. 4.2.14.5) und durch Elektrophorese (vgl. 4.2.14.4) charakterisiert.

Die Reinheitsbestimmung der IgG-Fraktion erfolgte mittels Immunelektrophorese (4.2.14.3). Die Spezifität der Antikörper wurde durch Western-Blot-Analyse (siehe 4.2.14.6) und Enzymimmunoassay (siehe 4.2.14.8) untersucht.

4.2.14.3 Immunelektrophorese

Immunelektrophoresen wurden auf Agarose-Gelen (10 g (w/v) Agarose/143 mmol/l 5,5-Diethylbarbiturat, 43 mmol/l Natriumacetat, pH 8,2) durchgeführt. 0,01 ml der IgG-Lösung wurden aufgetragen und 100 Minuten bei 150 V in einer wassergekühlten Kammer elektrophoriert. Anschließend wurde der Antiserum-Kanal freigelegt, mit Antiserum beschickt und über Nacht in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Danach wurden die Gele getrocknet, mit

physiologischer Kochsalzlösung und Wasser gewaschen und mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung (5 g/l in verd. Ethanol (450 ml/l Wasser)) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte in einer Lösung aus Ethanol, Wasser und Eisessig (50:50:11).

4.2.14.4 Elektroimmunodiffusion nach Laurell (Rocket-Immunelektrophorese) (58)

Zur Durchführung der Rocket-Immunelektrophorese wurden Antiserum-haltige Agarose-Gele (1 % (v/v) Antiserum in 10 g/l Agarose in 10 mmol/l 5,5-Diethylbarbiturat, 10 mmol/l 5,5-Diethylbarbitursäure, pH 8,6) gegossen. Antigen-Lösungen abnehmender Konzentrationen wurden aufgetragen und 3 Stunden bei 300 V unter Wasserkühlung elektrophoriert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele getrocknet, mit physiologischer Kochsalzlösung und mit Wasser gewaschen und mit Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt.

4.2.14.5 Titerbestimmungen

Titerbestimmung mittels Enzym-Immunoassay

Lösungen:

Puffer A: 0,015 mol/l Na_2CO_3 , 0,35 mol/l NaHCO_3 ,
0,02 % (w/v) NaN_3 , pH 9,6

Puffer B: 1,5 mol/l NaCl , 0,1 mol/l K_2HPO_4 ,
0,05% (w/v) Tween 20, pH 7,4

Puffer C: 0,137 mol/l NaCl , 2,7 mol/l KH_2PO_4 , 0,05% (w/v) Tween 20, pH 7,4. Kurz vor Gebrauch noch 1 % (w/v) Rinderserumalbumin (100 mg/ml) dazugeben.

Puffer D: 0,1 mol/l Citronensäure, 0,1 mol/l K_2HPO_4 ,
pH 4,5

Substrat-

Lösung : 9,5 ml Lösung D + 0,5 ml ABTS-Lösung (200
mg/ml Wasser) + 0,2 ml H_2O_2 -Lösung (0,06 ml
30%iges H_2O_2 auf 100 ml Wasser)

Mikrotiterplatten wurden mit 0,20 ml LNPI-Lösung pro Kavität (1 μ g/ml Puffer A) beschickt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Platten gründlich mit Puffer B gewaschen. Das zu untersuchende Serum wurde ausgehend von einer Verdünnung von 1:20 jeweils im Verhältnis 1:2 mit Puffer C weiter verdünnt. Von den so erhaltenen absteigenden Konzentrationen wurden jeweils 0,2 ml pro Mikrotiterplatten-Kavität pipettiert und 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde wieder mit Lösung B gewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Kavitäten mit 0,2 ml eines anti-Kaninchen IgG-Peroxidase-Konjugat beschichtet (Verdünnung 1 : 1000). Die Platten wurden danach 2 h bei 37°C inkubiert, erneut gewaschen und mit 0,2 ml Lösung E pro Kavität bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurden die Extinktionen mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Readers (Mikro ELISA Reader MR 700, Fa. Dynatech, Denkendorf) bei 405 nm gemessen. Die Titerkurve wurde graphisch dargestellt. Ein relatives Maß für den "Antikörpertiter" war das Volumen des eingesetzten Serums, bei dem die halbmaximal meßbare Bindung erreicht wurde.

Titerbestimmung mit Pansorbin A^R:

Nach Immunselektion der Antiseren mittels der LNPI-Sepharose-Säule wurden die Titer der erhaltenen Antikörperlösungen mit Pansorbin A^R bestimmt. Eine konstante Menge LNPI wurde zur Immunpräzipitation mit steigenden Verdünnungen einer Lösung der immunselektierten anti-

LNPI-IgG versetzt. Nach Komplexierung mit Pansorbin A^R konnte der Antikörper-gebundene Inhibitor durch Zentrifugation aus der Lösung entfernt werden. Nicht gebundener LNPI wurde in einem Chymotrypsin-Hemmtest bestimmt.

Ansatz:

0,02 ml	Inhibitor-Lösung (20 µg/ml)
0,01 ml	Antikörper-Lösung in Chymotrypsin-Testpuffer ohne Triton X-100 (vgl. 4.2.3.1)

1 Stunde bei 37°C inkubieren

0,05 ml	Pansorbin ^R -Lösung (100 mg/ml)
---------	--

1 Stunde bei 37°C inkubieren

Anschließend wurde abzentrifugiert und die Hemmaktivität gegenüber Chymotrypsin im Überstand bestimmt (vgl. 4.2.6.2). Nach graphischer Auftragung der Inhibitor-Aktivität gegen die Antikörper-Verdünnungen ergab sich beim extrapolierten Schnittpunkt der Titerkurve mit der Abszisse der Äquivalenzpunkt, der ein Maß für den Titer der Antikörper (mg gebundener LNPI/ml Antikörper-Lösung) ist.

4.2.14.6 Western-Blot-Analyse (59)

Transblott-Puffer:

- A: 0,3 mol/l Tris, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4.
B: 0,025 mol/l Tris, 20 % (v/v) Methanol, pH 10,4.
C: 0,4 mol/l ϵ -Aminocaprönsäure, 0,025 mol/l Tris,
20 % (v/v) Methanol, pH 9,4.

Zunächst wurde eine SDS-Elektrophorese nach Laemmli (vgl. 4.2.1) angefertigt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf die Nitrocellulose transferiert. Als Elektroden dienten zwei Graphitplatten. Bedingungen: 100 mA, 10 V. Dauer: 1 Stunde. Die Detektion der transferierten Proteine erfolgte mittels Immunogold-Färbung mit anschließender Silberverstärkung (60).

Der Immuno Gold Silver Stain Kit enthielt folgende Reagentien: anti-(Kaninchenimmunglobulin G) IgG von der Ziege (goldmarkiert), Rinderserumalbumin, Gelatine, Enhancer, Initiator und Fixierlösung.

Folgende Lösungen wurden vorbereitet:

- Lösung A: 200 mmol/l Tris, 1,54 mol/l NaCl, pH 8,2
Lösung B: 20 mmol/l Tris, 0,9% (w/v) NaCl, pH 8,2
Lösung C: 5% (w/v) Rinderserumalbumin, 20 mmol/l NaN_3
in Lösung B
Lösung D: 0,1% (w/v) Rinderserumalbumin in Lösung B
Lösung E: 1% (v/v) Rinderserumalbumin in Lösung D
Lösung F: 0,4% (w/v) Gelatine in Lösung D
Lösung G: 0,94 g Enhancer/ 20 ml H_2O
Lösung H: 1,56 g Initiator/ 20 ml H_2O
Lösung I: Fixier-Lösung aus Kit 1 : 10 mit Wasser
verdünnen

Nach Beendigung des Elektrotransfers der Proteine wurde die Nitrocellulose 1 Stunde bei Raumtemperatur in Lösung C inkubiert. Dann wurde mit dem "ersten" Antikörper (1,5 µg/ml in Lösung E) 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Nitrocellulose in Lösung D wurde anti - (Kaninchenimmunglobulin G) IgG (goldmarkiert) (1:100 verdünnt in Lösung F) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Verstärkung durch Silber wurde zunächst zweimal in Lösung D und dann dreimal in bidest. Wasser gewaschen. Lösung G und Lösung H wurden vereinigt und sofort zur Nitrocellulose gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Lösung I gestoppt.

4.2.14.7 Konjugat-Synthesen

Synthese eines anti-LNPI-IgG Peroxidase-Konjugates mittels der Perjodat-Methode (61,62)

Mit der nach Steinbuch et al. (57) gewonnenen anti-LNPI-IgG-Fraktion wurde mittels der Perjodat-Methode ein Peroxidase-Konjugat synthetisiert.

Folgende Lösungen wurden verwendet:

Lösung A : 0,1 mol/l NaJO_4 in Wasser

Lösung B : 1 mmol/l Natriumacetat

Lösung C : 0,2 mol/l Carbonatpuffer pH 9,5

Lösung D : 10 mmol/l Carbonatpuffer pH 9,5

Lösung E : 1 mmol/l NaBH_4

Lösung F : gesättigte Ammonsulfatlösung

Lösung G

(PBS-Puffer) : 0,137 mol/l NaCl , 2,7 mmol/l KCl ,
6,5 mmol/l Na_2HPO_4 , 1,5 mmol/l KH_2PO_4 ,
pH 7,2.

4 mg Peroxidase wurden in 1 ml dest. Wasser gelöst und zu 0,2 ml Lösung A gegeben. Die Mischung wurde 20

Minuten bei Raumtemperatur gerührt und dann über Nacht bei 4°C gegen 1 l Lösung B dialysiert.

8 mg anti-LNPI-IgG wurden in 1 ml Lösung D gelöst. Zum dialysierten Peroxidase-Ansatz wurden 0,02 ml Lösung C gegeben. Dazu wurde sofort die IgG-Lösung zupipettiert. Der Reaktionsansatz wurde 2 Stunden bei 25°C "end über end" bewegt. Dann wurden 0,1 ml Lösung E zugegeben, gut gemischt und 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das gleiche Volumen an Lösung F zugegeben, 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und abzentrifugiert (10 Minuten bei 10 000 g). Der Niederschlag wurde zweimal mit 50%iger Ammoniumsulfatlösung gewaschen und abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde schließlich in 2 ml Lösung G gelöst, über Nacht bei 4°C gegen 1 l Lösung G dialysiert und die Ausbeute durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt.

Zur Konjugat-Lösung wurde 1% Rinderserumalbumin zugesetzt, abzentrifugiert und in Portionen zu 0,1 ml in Eppendorf-Gefäße pipettiert. Die Aliquote wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Synthese eines LNPI-alkalische Phosphatase-Konjugates

Das LNPI-alkal. Phosphatase-Konjugat wurde mittels der SPDP-Methode (63) dargestellt.

Folgende Lösungen wurden verwendet :

Lösung A : 0,1 mol/l Natriumphosphat, 0,1 mol/l NaCl,
pH 7,5

Lösung B : Lösung A + 1 mmol/l $MgCl_2$

Lösung C : 0,1 mol/l Natriumacetat, 0,1 mol/l NaCl,
pH 4,5

Lösung D : 50 mmol/l DTT in Lösung C

Lösung E : 10 mmol/l SPDP in abs. Ethanol

Lösung D und E wurden jeweils frisch angesetzt.

Darstellung von "Thiopyridyl-LNPI"

1 mg LNPI in 1 ml Lösung A wurde mit 0,1 ml Lösung E versetzt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Reduktion zu "Thiopropyl-LNPI"

Der "Thiopyridyl-LNPI"-Reaktionsansatz wurde über eine mit Lösung D äquilibrierte PD 10 Säule gereinigt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden danach zusätzlich 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die niedermolekularen Reaktionsprodukte wurden durch Gelfiltration über eine mit Lösung A äquilibrierte PD 10 Säule abgetrennt.

Darstellung der "Thiopyridyl-Enzym"-Komponente

0,25 ml alkal. Phosphatase (3fach molarer Überschuß) wurden in 1 ml Lösung B aufgenommen und mit 0,1 ml Lösung E versetzt. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die niedermolekularen Reaktionsprodukte wurden durch Gelfiltration über eine PD 10 Säule (mit Lösung B äquilibriert) gereinigt.

Die Thiopropyl- und die Thiopyridyl-Komponente wurden zusammengegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Dannach wurde der Ansatz gegen 2 x 5 l Puffer A dialysiert. Zu der dialysierten Lösung wurden 0,2 % (w/v) NaN_3 und 1 % (w/v) Rinderserumalbumin gegeben, abzentrifugiert und portioniert. Die Aliquote wurden bei 4°C gelagert.

4.2.14.8 Enzymimmunoassay

Es wurde ein Enzymimmunoassay zur Bestimmung von LNPI nach dem Sandwich-Prinzip ausgearbeitet.

Verwendete Lösungen:

Puffer A bis D sind mit den Puffern von 4.2.14.5 identisch.

Antikörper-Lösung: anti-LNPI IgG (1,0 mg/ml Lösung A)

Antigen-Lösung : LNPI(1 ug/ml Lösung C)

Konjugat-Lösung : anti-LNPI-IgG-Peroxidase-Konjugat
(vgl. 4.2.14.7) in Lösung C

0,20 ml Antikörper-Lösung (2 μ g/ml Lösung A) wurden in die Kavität einer Mikrotiter-Platte pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 5 x mit Lösung B gewaschen. Verdünnungsreihen der Plasma-Proben bzw. des Standards (Ausgangskonzentration der Antigen-Lösung : 0,1 μ g/ml Lösung C) wurden hergestellt und in die Kavitäten jeweils 0,20 ml pipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation der Platte über Nacht bei 4°C. Danach wurde 5 x mit Lösung B gewaschen, pro Kavität 0,20 ml Konjugat-Lösung in optimierter Verdünnung zugegeben und 3 h bei 37°C inkubiert. Dann wurde 5 x mit Lösung B gewaschen, 0,20 ml Substrat-Lösung pro Kavität pipettiert und weiter 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte sofort bei 405 nm im Mikrotiter Platten-Reader vermessen. Die graphische Auswertung erfolgte auf halblogarithmischem Papier.

4.2.14.9 Biolumineszenz-Enzymimmunoassay (64)

Zur ultrasensitiven Bestimmung von LNPI wurde ein modifizierter kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay ausgearbeitet.

Lösungen:

Puffer A bis C sind mit den Puffern aus 4.2.14.5 identisch.

Antikörper-Lösungen: Immunselektierte anti-LNPI IgG in einer Verdünnung, die 20 pg LNPI/ml bindet (nach Titration mit Pansorbin A^R);

anti-LNPI IgG isoliert nach Steinbuch zum Beschichten der ELISA-Platten (2 mg/ml).

Antigen-Lösung: LNPI (0,005 - 100 pg/ml).

Konjugat-Lösung: LNPI - alkalische Phosphatase-Konjugat (1 : 500 verdünnt).

Substrat-Lösung: Luciferin-O-Phosphat (10^{-5} mol/l in 0,01 mol/l DEA-Puffer, pH 9,8, enthält 0,5 mmol/l $MgCl_2$)

Die Inkubationen wurden in silikonisierten Eppendorf-Gefäßen durchgeführt.

Inkubationsansatz:

0,050 ml Antikörper-Lösung

0,050 ml Antigen-Lösung bzw. Probe

8 h bei 4°C inkubieren

0,050 ml LNPI-alkal.Phosphatase-Konjugat

Über Nacht bei 4°C inkubieren

0,010 ml Protein A -Sephrose Suspension (50 mg/ml
Puffer C)

2 h bei 4°C inkubieren

0,060 ml Puffer C

Der Ansatz wurde abzentrifugiert (10 min bei 10 000 g);
0,2 ml des Ansatzes wurden auf eine Mikrotiter-Platte
gegeben, die über Nacht mit 2 µg/ml anti-LNPI-IgG be-
schichtet worden war.

3 h bei 37°C inkubieren.

Waschen der Platte (5 x mit Puffer B)

0,200 ml Substrat-Lösung

30 Minuten bei 37°C inkubieren

Zur Bestimmung der Lichtimpulse, die durch die Umsetzung
des aus Luciferin-O-Phosphat freigesetzten Luciferins
durch Luciferase entstehen, wurde folgender Ansatz ver-
wendet (64):

0,40 ml Testpuffer (50 mmol/l HEPES, 6,6 mmol/l $MgCl_2$,
0,66 mmol/l EDTA, 0,1 mmol/l DTT, 5 mmol/l ATP,
pH 7,55, 1 μg Luciferase)

1 Minute bei 25°C im Luminometer inkubieren

0,1 ml Inkubationsansatz

Nach 10 Sekunden wurde das emittierte Licht in einem Luminometer (Berthold 9500 T) gemessen.

Folgende Leerwerte für den Inkubationsansatz und die Plattenbeschichtung wurden zur Kontrolle immer mitbestimmt:

Inkubationsansatz: a) Antikörper + Konjugat ohne Antigen
b) Antigen + Konjugat ohne Antikörper
c) nur Antikörper
d) nur Antigen
e) nur Konjugat
f) nur Puffer C

Plattenbeschichtung: a) ohne Antikörperbeschichtung
b) ohne Inkubationsansatz
c) ohne Substratlösung

4.2.15 Elektronenmikroskopische Lokalisation des Inhibitors (65)

LNPI wurde immunhistochemisch unter Verwendung von Protein A-Gold Komplexen in isolierten Leukozyten lokalisiert. Die Isolierung der Leukozyten aus Schweineblut erfolgte wie unter 4.1 beschrieben durch Dextran-Sedimentation mit anschließenden Reinigungsschritten.

Die Leukozyten wurden nach folgender Vorschrift fixiert: 10^6 Zellen wurden 45 Minuten bei 4°C in 0,05 mol/l

Cacodylatpuffer, pH 7,2, der 2,5 % (v/v) Glutardialdehyd enthielt (frisch angesetzt) fixiert. Dann wurde 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (600 x g). Die Pellets wurden zweimal 20 Minuten in je 10 ml Cacodylatpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert (10 Minuten bei 4°C und 600 x g). Die erhaltenen Pellets wurden in 50 % (v/v) Ethanol aufgenommen und darin aufbewahrt. Es erfolgte keine Nachfixierung der Zellen. Die Zellen wurden nach Entwässerung über Ethanol/Propylenoxid in Azaldit eingebettet. Von den eingebetteten Zellen wurden Ultradünnschnitte auf Nickelgrids angefertigt. Die Schnitte wurden nach Präinkubation in PBS-Puffer, der 1 % (w/v) Rinderserumalbumin enthielt, 2 Tage mit Anti-LNPI-Serum (1 : 500 bzw. 1 : 1000 verdünnt in PBS-Puffer) bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBS/BSA-Puffer wurde 2 h mit Protein A-Gold-Lösung (1 : 20 verdünnt in PBS-Puffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen der Schnitte angefertigt. Nachkontrastieren erfolgte in Uranylacetat/Bleiacetat.

4.2.16 Pathobiochemische Untersuchungen am Schwein

Es wurden in vivo und in vitro Versuche zur Untersuchung der Freisetzung von LNPI aus den Leukozyten durchgeführt.

Untersuchungen am Sepsis-Modell des Schweins

In vivo Untersuchungen wurden am Sepsis-Modell des Schweins (66) durchgeführt. Die Sepsis wurde durch zweistündige intravenöse Infusion von 3×10^{10} E. coli-Zellen in deutschen Läufer Schweinen (16 - 23 kg Körpergewicht) induziert. Im Abstand von 2 Stunden wurden Plasma-Proben gewonnen. In den Plasmen wurde LNPI mittels LNPI-Sandwich-Enzymimmunoassays (siehe 4.2.14.8) bestimmt.

In vitro Stimulierung der Schweine-Leukozyten

In vitro Stimulierungsversuche an Leukozyten wurden mit Heparin-Vollblut und mit gewaschenen Leukozyten durchgeführt. Die Stimulation der Leukozyten erfolgte mit Endotoxin (0,5 mg/ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung), E. coli ($1,5 \times 10^8$ Zellen) und Zymosan (58,3 mg/ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung).

50 ml Heparin-Blut wurden in 8 Portionen zu 6 ml aufgeteilt. 4 Proben dienten als Vollblut-Proben und aus den restlichen 4 Proben wurden die Leukozyten isoliert (siehe 4.1). Nach der Isolierung wurden die Leukozyten in 6 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung aufgenommen. Die Proben wurden mit 0,12 ml Stimulierungsreagenz bzw. 0,12 ml 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung (Leerwert) versetzt und bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden aus den Ansätzen 0,5 ml entnommen, sofort abzentrifugiert (2,5 Minuten bei 10 000 g) und die Überstände tiefgefroren. In den Überständen wurde nach Abschluß der Serie der LDH-Gehalt mittels Enzymtest (siehe 4.2.3.8) und der LNPI-Gehalt mittels LNPI-Sandwich-Enzymimmunoassay (siehe 4.2.14.8) bestimmt.

5.1 Isolierung des Neutralen Proteinaseinhibitors aus Schweineleukozyten (LNPI)

Die zur Isolierung von LNPI verwendeten Leukozyten wurden aus 1 Liter frischem Schweineblut isoliert (vgl.4.1). Dies entsprach einer durchschnittlichen Leukozytenzahl von ca. $2,5 \times 10^{11}$ Zellen pro Ansatz. Die Auftrennung des Blutes erfolgte durch Dextran-Sedimentation. Zur Entfernung der noch vorhandenen Erythrozyten aus dem Überstand mußten diese durch hypotone Hämolyse zusätzlich zerstört werden. Nach zweifacher Hämolyse und zweifachem Waschen war das Leukozyten-Pellet Erythrozyten-frei. Durch die Hämolyse wurden nur ca. 5 % der Leukozyten zerstört.

5.1.1 Aufschluß der Leukozyten

Die Leukozyten-Suspension in Saccharose-Lösung (vgl. 4.1) wurde 15 min bei 900 psi (= 5400 kPa) im Drucktopf (Cell Disruption Bomb Bulletin 4635; Parr Instrument Company) mit N_2 gesättigt. Danach wurden die Zellen durch Druckabfall und das Herauspressen aus dem Drucktopf während des Belüftens zerstört. Der Aufschluß wurde anschließend 15 Minuten im Eisbad gekühlt.

Um die Leukozyten vollständig zu desintegrieren, erfolgte noch eine zusätzliche Ultraschall-Behandlung (Branson Sonifier; 4 Beschallungen mit einer Dauer von 20 s). Der Zellaufschluß wurde anschließend 10 min bei 4°C zur Abtrennung der Kern-, Membran- und Zellfragmente bei 135 x g abzentrifugiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde danach zur vollständigen Abtrennung von Partikeln 60 min

bei 4°C zentrifugiert (10 000 x g). Der so erhaltene Überstand enthielt das Cytosol, der Niederschlag die Granula-Fraktion. Bis zum weiteren Gebrauch wurden Cytosol- und Granula-Fraktion getrennt bei -20°C gelagert.

5.1.2 Untersuchungen zur Hemmaktivität des Cytosols

Die Hemmaktivität der gewonnenen Cytosolfraktion auf verschiedene Enzyme wurde untersucht: α -Chymotrypsin, Leukozyten-Elastase und Trypsin wurden gehemmt. In Tabelle 2 sind die gemessenen Hemmaktivitäten zusammengefaßt.

Enzym	Hemmaktivität (IU/ml Cytosol)*
α -Chymotrypsin	0,6 $\pm$ 0,1
Leukozyten-Elastase	0,07 $\pm$ 0,01
Trypsin	0,007 $\pm$ 0,001

Tab.2 Hemmaktivität des Cytosols aus Schweineleukozyten.

* Mittelwerte aus 5 verschiedenen Cytosol-Präparationen.

Hemmaktivitäten gegenüber Papain, Gewebe- und Plasmakallikrein wurden nicht gefunden.

5.1.3 Vorversuche zur Isolierung des LNPI

In ersten orientierenden Experimenten wurde versucht, den Inhibitor durch Affinitätschromatographie anzureichern. Dazu wurden Elastase und α -Chymotrypsin jeweils an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden (vgl. 4.2.7). Nach Äquilibration der Säulen mit 0,05 mol/l Tris/HCl Puffer, pH 7,4, der 1 mol/l NaCl enthielt, wurden 0,5 ml Cytosol auf die Leukozyten-Elastase- bzw. Chymotrypsin-Sepharosesäule aufgetragen. Der Hemmstoff für Chymotrypsin und Leukozyten-Elastase wurde an die Sepharose gebunden; er konnte weder durch Änderung des pH-Wertes noch durch Verwendung chaotroper Salze (5 mol/l NaCl, 2,5 mol/l NaSCN, und 5 mol/l NaSCN) wieder abgelöst werden. Auch ein affinitätschromatographischer Reinigungsversuch unter Verwendung von Anhydro-Chymotrypsin-Sepharose war erfolglos.

Um den Inhibitor anzureichern, wurde deshalb das Cytosol mittels Gelfiltration aufgetrennt. Von den untersuchten Trennmedien zeigte Sephadex G-75 superfine die beste Trenneigenschaft.

5.1.4 Reinigung des Inhibitors aus Leukozyten-Cytosol

Mit der folgenden optimierten Isolierungsmethode konnte LNPI schließlich rein dargestellt werden:

50 ml Cytosol wurden bei 4°C auf eine Sephadex G-75 superfine Säule (125 x 4 cm), die mit 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,4 (enthält 1 mol/l NaCl) äquilibriert war aufgetragen. Die Flußrate betrug 25 ml/h; es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 7,5 ml gesammelt (Abb. 1). Die LNPI-haltigen Fraktionen wurden vereint und bei 4°C über Nacht gegen 15 l 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer pH 5,0, dialysiert. Nach Abzentrifugation ausge-

fallener Proteine wurde der erhaltene Überstand durch Ultrafiltration (Amicon YM 10 Membran) konzentriert.

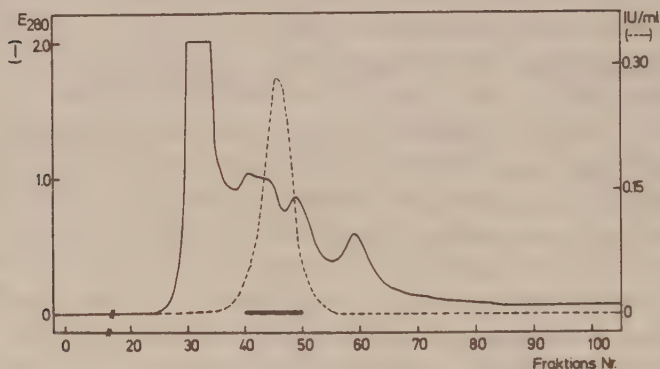


Abb. 1 Gelchromatographische Auftrennung des Schweineleukozyten-Cytosols an Sephadex G-75 superfine. —, E_{280} ; ---, Chymotrypsin-inhibition in IU/ml.

Das Ultrafiltrations-Konzentrat (10 ml) wurde bei Raumtemperatur auf eine Mono S HR 5/5 Säule, die gegen 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,00 äquilibriert worden war aufgetragen. Die Flußrate betrug 1,5 ml/min. LNPI wurde mittels eines pH-Gradienten, der aus 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,00 und 0,05 mol/l Tris/HCl-Puffer, pH 7,50, gebildet wurde, eluiert (Abb. 2). Die LNPI-haltigen Fraktionen wurden vereint und bei 4°C über Nacht gegen 10 l 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,40 dialysiert.

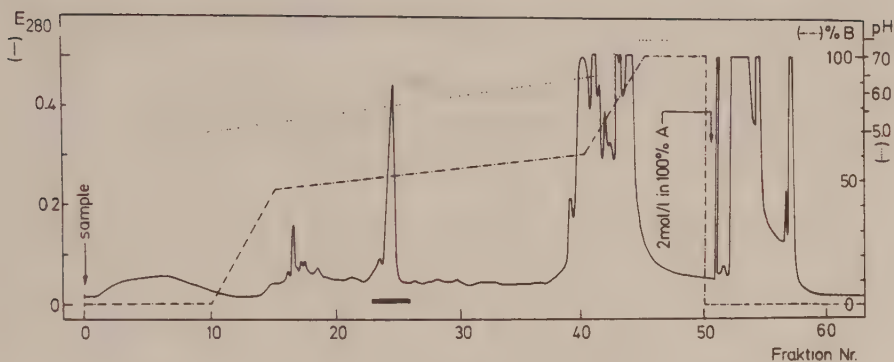


Abb.2 Ionenaustauschchromatographie von LNPI an Mono S. FPLC-System Nr.1; —, E₂₈₀; ..., pH-Gradient; - - -, % (v/v) Puffer B des Elutions-Puffergemischs.

10 ml des Dialysats wurden bei Raumtemperatur auf eine Mono S HR 5/5 Säule, die gegen 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,40, äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Flußrate betrug 1,5 ml/min. Die Elution des gebundenen LNPIs erfolgte durch einen pH-Gradienten, der aus 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,40 und 0,05 mol/l Natriumacetat-Puffer, pH 5,65, gebildet wurde (Abb. 3). Die LNPI-haltigen Fraktionen wurden vereint und bei -20°C gelagert. Unter diesen Bedingungen war der Inhibitor mehr als 18 Monate stabil.

Die Anreicherung des Inhibitors ist in Tabelle 3 schematisch zusammengefaßt.

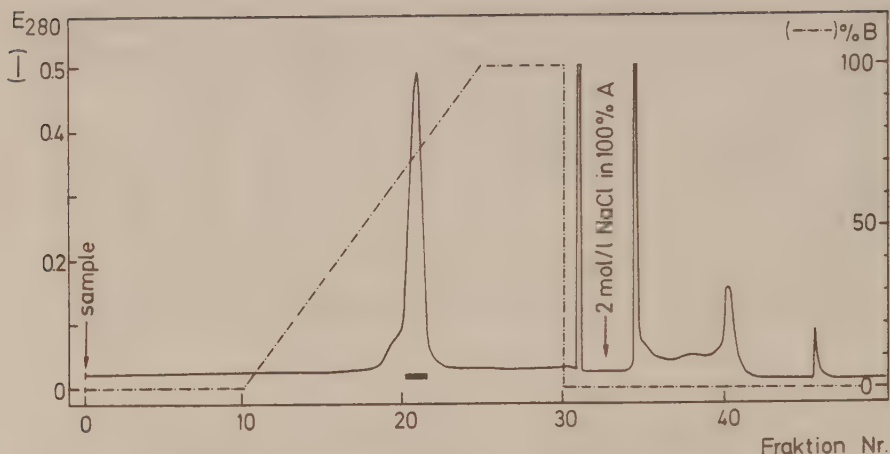


Abb. 3 Ionenaustauschchromatographie von LNPI an Mono S. FPLC-System Nr. 2; —, E_{280} ; - - -, % (v/v) Puffer B des Elutions-Puffergemischs.

Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Proteingehalt (mg)	Gesamt inhibitor-Aktivität* (IU)	Spezifische Inhibitor-Aktivität* (IU/mg)	Anreicherungs-faktor
Schweineleukozyten-Cytosol	50	160	30	0.19	1
Gelfiltration	80	30	52	1.74	9
FPLC-System 1	20	2.5	20	8	43
FPLC-System 2	10	1	10	10	53

* Hemmung von α -Chymotrypsin

Tab. 3 Anreicherung von LNPI aus Schweineleukozyten-Cytosol. Die Werte sind Mittelwerte aus vier Isolierungen.

5.2 Reinheitskriterien

Die Einheitlichkeit der gewonnenen Inhibitor-Präparation wurde mittels SDS-Elektrophoresen (vgl. 4.2.1) und quantitativen N-terminalen Aminosäureabbaus (vgl. 4.2.11) überprüft.

In SDS-Elektrophoresen konnte unter reduzierenden Bedingungen nur eine Proteinbande (Abb. 4) nach Silberfärbung gefunden werden. (Nachweisgrenze: $0,1 \text{ ng/mm}^2$ (26)).



Abb.4 SDS-PAGE von LNPI unter reduzierenden Bedingungen.

a) LNPI (0,01 mg),

b) Molekulargewichts-Standard: Phosphorylase B (92,5 kDa), Albumin (60 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Sojabohnentrypsininhibitor (21,5 kDa), Lysozym (14,4 kDa).

Nach Edman-Abbau von 10 nmol Inhibitor konnte keine PTH-Aminosäure in der HPLC (Nachweisgrenze: 0,015 nmol) nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure des Inhibitors blockiert und dadurch dem Abbau nicht zugänglich ist. Das Auffinden keiner weiteren PTH-Aminosäure ist ein zuverlässiges Indiz für den hohen Reinheitsgrad der LNPI-Präparation, da damit Peptide bis zu einem Mol-Anteil von ca. 0,02 % als Beimengungen erkannt worden wären.

5.3 Untersuchungen zur Primärstruktur von LNPI

Infolge der Blockierung des N-Terminus des LNPI war eine Sequenzierung vom N-terminalem Ende nicht möglich. Das Molekül wurde daher durch CNBr-Behandlung in Bruchstücke gespalten und das Gemisch über HPLC aufgetrennt. Die Sequenz des Bruchstücks, das nach HPLC-Auftrennung in höchster Konzentration vorhanden war, ist in Abb. 5 im Vergleich zu den Sequenzen von humanem α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1 PI), Antithrombin III (AT III) und Ovalbumin dargestellt. Der Vergleich zeigt, daß dieses LNPI-Bruchstück bis zu 45 % Sequenzhomologien zu den Serpinen (Serinproteinase-Inhibitoren) besitzt.

		361											
	α_1 PI	Pro	Pro	Glu	-	Val	Lys	Phe	-	-	Asn	Lys	
	AT III	Asn	Pro	Asn	Arg	Val	Thr	Phe	Lys	Ala	Asn	Arg	
	Ovalbumin	Ser	Glu	Glu	-	-	-	Phe	Arg	Ala	Asp	His	
	LNPI	Pro	Glu	Glu	-	-	Asp	Phe	Ile	Ala	Asp	His	
		369											
	α_1 PI	Pro	Phe	Val	Phe	Leu	Met	Ile	Glu	Gln	Asn	Thr	
	AT III	Pro	Phe	Leu	Val	Phe	Ile	Arg	Glu	Val	Pro	Leu	
	Ovalbumin	Pro	Phe	Leu	Phe	Cys	Ile	Lys	His	Ile	Ala	Thr	
	LNPI	Pro	Phe	Ile	Phe	Phe	Ile	Val	Ile	Leu	Leu	Pro	
		380					386						
	α_1 PI	Lys	Ser	Pro	Leu	-	-	Phe	Ile	Gly			
	AT III	Asn	Thr	Ile	Ile	-	-	Phe	Met	Gly			
	Ovalbumin	Asn	Ala	Val	Leu	-	-	Phe	Phe	Gly			
	LNPI	Asp	Ser	Ile	Glu	Asp	Glu	Ser	Phe	Gly			

5.4 Chemische und physikochemische Eigenschaften

Molekulargewicht

reduzierenden Bedingungen treten unter den gleichen Elektrophorese-Bedingungen höhermolekulare Proteinbanden auf (Abb. 6), die auf die Bildung von Aggregaten hindeuten.

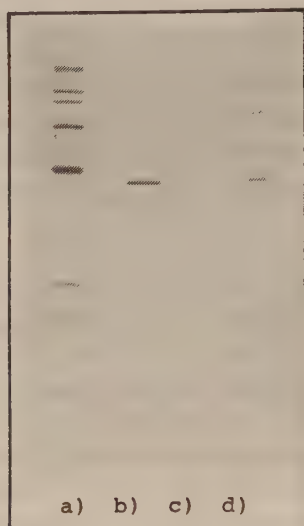


Abb. 6 SDS-PAGE von LNPI unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

a) Molekulargewicht-Standards: Myosin (200 kDa), β -Galaktosidase (116,25 kDa), Phosphorylase B (92,5 kDa), Rinderserumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboxyanhydrase (31 kDa), Sojabohnentrypsininh inhibitor (21,5 kDa), Lysozym (14,4 kDa)).

b) LNPI nach Inkubation mit 5 % (w/v) DTT bei 100°C.

c) Elektrophorese-Puffer als Kontrolle.

d) LNPI nach Inkubation ohne DTT bei 100°C.

Isoelektrischer Punkt

Bei der isoelektrischen Fokussierung von LNPI in Serva-lyt- und Harnstoff-haltigen Polyacrylamid-Gelen (Gradient von pH 2 bis 11) treten mehrere Proteinbanden im Bereich von pH 7,0 bis pH 7,5 auf (Abb. 7).

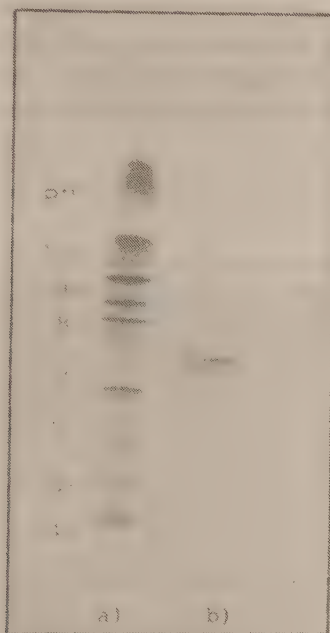


Abb. 7 Isoelektrische Fokussierung von LNPI.

a) pI-Markerproteine (pI): C-Phycocyanin von *A.nidulans* (4,65;4,85), Azurin von *P.aeruginosa* (5,65), Trifluoracetyliertes Myoglobin Met vom Schwein (5,92), Myoglobin Met vom Schwein (6,45), Myoglobin Met vom Pferd (7,30), Myoglobin Met vom Wal (8,30), Cytochrom C vom Pferd (10,6).

b) LNPI (0,01 mg).

Kohlehydratbestimmung

Nach SDS-PAGE von LNPI wurde eine Kohlehydratanfärbung mit Dansylhydrazin durchgeführt. Zunächst erfolgt eine Oxidation mit Perjodsäure. Die dabei entstehenden Aldehyd-Gruppen werden in einem zweiten Reaktionsschritt an Dansylhydrazin unter Bildung der Hydrazone-Derivate addiert. Mit NaBH_4 erfolgt abschließend eine Reduktion zu den stabileren Hydrazin-Derivaten. Abb. 8 zeigt die fluoreszierende LNPI-Dansylhydrazin-Bande im SDS-Gel.

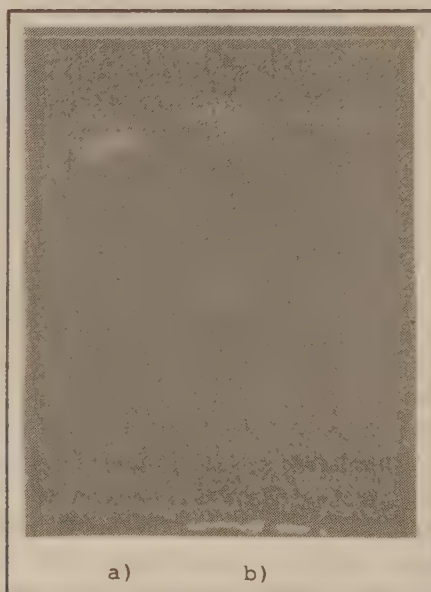


Abb. 8 SDS-PAGE von LNPI nach Dansylhydrazin-Kohlehydrat-Anfärbung. (Durchlicht von 302 nm).
a) 0,01 mg Ovalbumin (Kontrolle).
b) 0,01 mg LNPI.

pH-Stabilität

Die Abhängigkeit der Hemmung von α -Chymotrypsin durch LNPI nach vorheriger Inkubation des Inhibitors bei verschiedenen pH-Werten ist in Abb. 9 dargestellt. Dazu wurde LNPI 24 h bei unterschiedlichen pH-Werten und 4°C inkubiert und die danach verbliebene Hemmwirkung gemessen. Es zeigte sich, daß bei pH-Werten $< 5,0$ die Hemmaktivität verloren geht, während der Inhibitor ohne Verlust der Hemmaktivität zwischen pH 5,0 und 10,0 aufbewahrt werden kann.

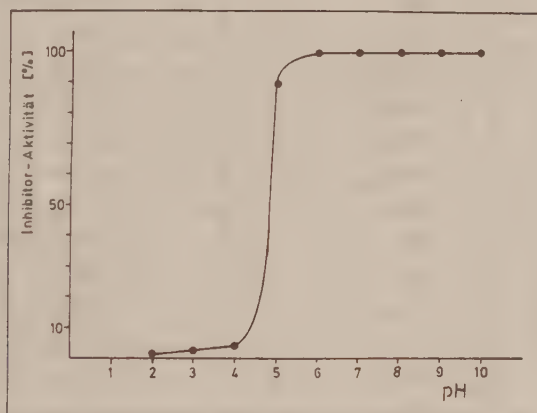


Abb. 9 Abhängigkeit der Hemmung von α -Chymotrypsin durch LNPI nach Vorinkubation von LNPI bei verschiedenen pH-Werten (24 h bei 4°C).

Aminosäurezusammensetzung

Die Aminosäurezusammensetzung (Tab. 4) wurde aus den Analysendaten von vier Aminosäureanalysen ermittelt, wobei ein Molekulargewicht von 40 kDa für LNPI zu Grunde gelegt wurde.

Aminosäure	LNPI
Asp	$35 \pm 0,5$
Thr	$18 \pm 0,2$
Ser	$28 \pm 0,4$
Glu	$38 \pm 0,5$
Pro	*
Gly	$20 \pm 0,3$
Ala	$36 \pm 0,4$
Cys	$3 \pm 0,2$
Val	$18 \pm 0,2$
Met	$10 \pm 0,4$
Ile	$20 \pm 0,5$
Leu	$48 \pm 0,3$
Tyr	$9 \pm 0,2$
Phe	$25 \pm 0,3$
Lys	$29 \pm 0,3$
His	$10 \pm 0,5$
Arg	$19 \pm 0,2$
Trp	*

Tab. 4 Aminosäurezusammensetzung von LNPI. Die Werte sind in mol Aminosäure pro mol Inhibitor angegeben. (* : diese Aminosäure wurde nicht bestimmt).

Sulfhydryl- bzw. Disulfidgruppengehalt

Die vorhandenen SH- bzw. S-S-Gruppen wurden zusätzlich zur Aminosäureanalyse noch gesondert bestimmt. Dazu wurde zuerst die Anzahl der freien SH-Gruppen des LNPI nach Grassetti (50) durch Kopplung von 4,4'-Dithiopyridin an eine nicht reduzierte Inhibitor-Probe ($0,84 \times 10^{-6}$ mol/l LNPI) ermittelt. Die gemessene Extinktionsänderung gegenüber dem Leerwert bei 324 nm ergab eine Molarität von $0,81 \times 10^{-6}$ mol/l, was einer freien SH-Gruppe pro Molekül LNPI entspricht.

In einem zweiten Bestimmungsansatz wurde die Gesamtzahl der im LNPI vorhandenen Cysteinreste gemessen. Dazu wurden vorhandene -S-S-Brücken mit NaBH_4 zu SH-Gruppen reduziert. Es ergab sich dabei für eine LNPI-Konzentration von $0,84 \times 10^{-6}$ mol/l im Testansatz eine Molarität von $2,27 \times 10^{-6}$ mol/l, was im Vergleich zu der eingesetzten Proteinmenge 2,7 SH-Gruppen pro Molekül LNPI entspricht. Dieser Wert stimmt mit der Zahl der Cysteinreste, die in der Aminosäureanalyse nach Oxidation mit Perameisensäure gefunden wurde, überein.

LNPI besitzt drei Cysteinreste, von denen unter nicht-reduzierenden Bedingungen ein Cysteinrest frei vorliegt.

5.5 Kinetische Untersuchungen

Zur kinetischen Charakterisierung der Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI wurde zuerst der Hemmechanismus untersucht. Die Bestimmung der Konstanten k_{on} und K_i diente dazu, die Stärke der Hemmung zu charakterisieren.

5.5.1 Untersuchungen zum Hemmechanismus

Zur Untersuchung des Hemmechanismus wurde die Hemmung verschiedenener Serinproteinasen durch LNPI bei unterschiedlichen LNPI- und Substratkonzentrationen gemessen.

Abb. 10 zeigt die Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI in Abhängigkeit von verschiedenen Substratkonzentrationen in der linearisierten Darstellungsweise nach Lineweaver und Burk (42).

Die erhaltenen Lineweaver-Burk-Diagramme für die einzelnen Serinproteinasen ergeben eine nichtkompetitive Hemmcharakteristik. Die aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelten K_M -Werte sind in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt.

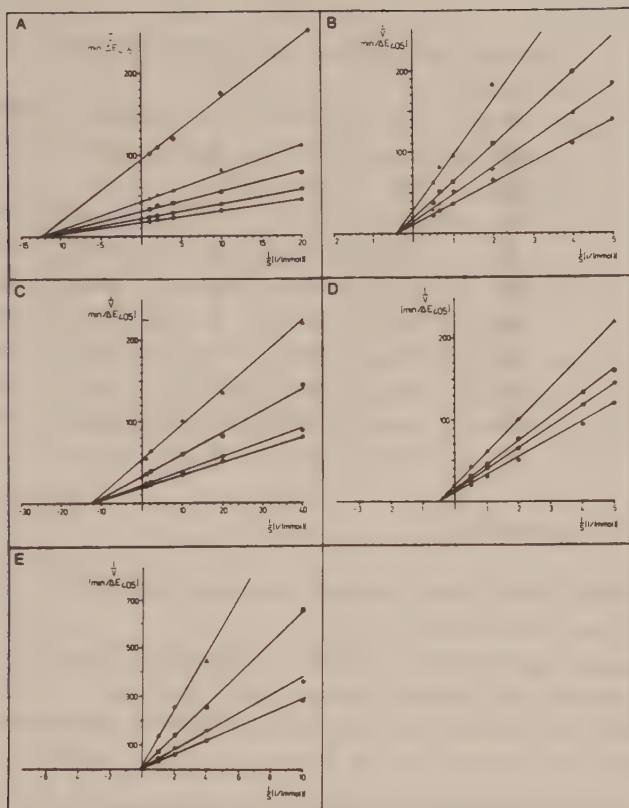


Abb. 10 Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI (Auswertung nach Lineweaver-Burk).

Die Hemmtests wurden wie unter 4.2.5 beschrieben durchgeführt.

A) α -Chymotrypsin (1,65 nmol/l)

B) Pankreas-Elastase (15 nmol/l)

C) Humane Leukozyten-Elastase (3,7 nmol/l)

D) Schweine-Leukozyten-Elastase (5,5 nmol/l)

E) Humanes Cathepsin G (33 nmol/l)

Die Konzentrationsangaben für die Enzyme beziehen sich auf Konzentrationen im Testsystem.

Folgende LNPI-Konzentrationen wurden im Test eingesetzt:

- A) ● 0,00 nmol/l LNPI, * 0,40 nmol/l LNPI,
■ 1,00 nmol/l LNPI, ▲ 1,50 nmol/l LNPI,
◆ 2,10 nmol/l LNPI.
- B) ● 0,00 nmol/l LNPI, * 4,20 nmol/l LNPI,
■ 8,40 nmol/l LNPI, ▲ 12,60 nmol/l LNPI.
- C) ● 0,00 nmol/l LNPI, * 1,05 nmol/l LNPI,
■ 2,10 nmol/l LNPI, ▲ 4,20 nmol/l LNPI.
- D) ● 0,00 nmol/l LNPI, * 1,46 nmol/l LNPI,
■ 2,92 nmol/l LNPI, ▲ 4,38 nmol/l LNPI.
- E) ● 0,00 nmol/l LNPI, * 21,0 nmol/l LNPI,
■ 42,0 nmol/l LNPI, ▲ 63,0 nmol/l LNPI.

5.5.2 K_i -Werte

Die Bestimmung der K_i -Werte erfolgte nach Green und Work (43) und nach Dixon (44).

Zunächst wurden die Titrationskurven der Hemmung verschiedenen Serinproteinasen durch LNPI bestimmt. Dazu wurden die Proteasen mit unterschiedlichen Mengen an LNPI vorinkubiert. Nach Substratzugabe wurde die verbleibende Rest-Enzymaktivität gemessen. Die Hemmkurven sind in Abb. 11 dargestellt.

Nach graphischer Bestimmung des Äquivalenzpunktes nach Green und Work konnten die K_i -Werte (vgl. Diskussion Seite 114, 115) berechnet werden (Tab. 5).

Die Berechnung des molaren Verhältnisses von Enzym und Inhibitor am Äquivalenzpunkt der Hemmung zeigte die Ausbildung eines äquimolaren Komplexes.

Zur Bestimmung der K_i -Werte nach Dixon (44) wurde die Hemmung der Serinproteinasen durch unterschiedliche LNPI-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Substratkonzentration untersucht. Die Diagramme sind in Abb. 12 zusammengefaßt. Aus den Kurven wurden die K_i -Werte (vgl. Diskussion Seite 114, 115) ermittelt (Tab. 5).

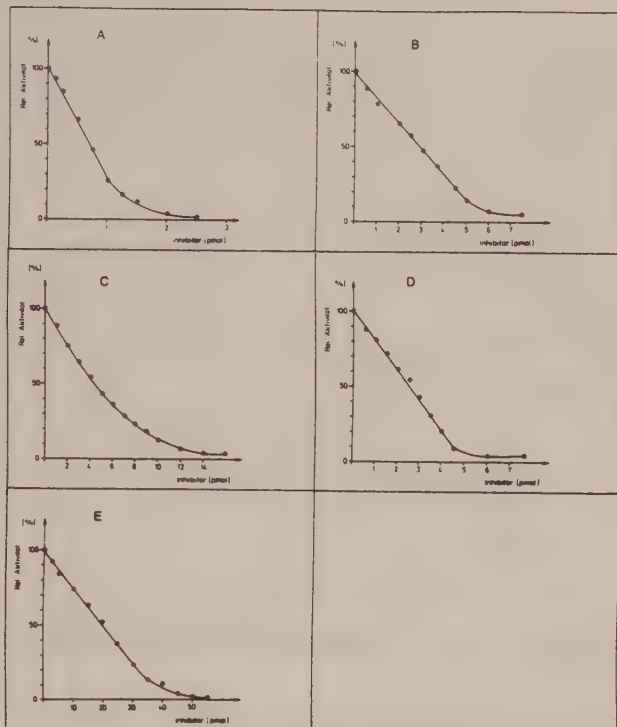


Abb. 11 Titrationskurven von Serinproteinasen durch LNPI.

Die Messung der Hemmung erfolgte gemäß der in 4.2.5 angegebenen Methodik.

A) α -Chymotrypsin (2,3 nmol/l); LNPI-Konzentration: 0 - 3,6 nmol/l

B) Pankreas-Elastase (8,6 nmol/l); LNPI-Konzentration: 0 - 7,5 nmol/l

C) Humane Leukozyten-Elastase (9,0 nmol/l); LNPI-Konzentration: 0 - 15 nmol/l

D) Schweine-Leukozyten-Elastase (7,2 nmol/l); LNPI-Konzentration: 0 - 7,5 nmol/l;

E) Humanes Cathepsin G (100 nmol/l), LNPI-Konzentration: 0 - 157 nmol/l.

Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf Konzentrationen im Testsystem.

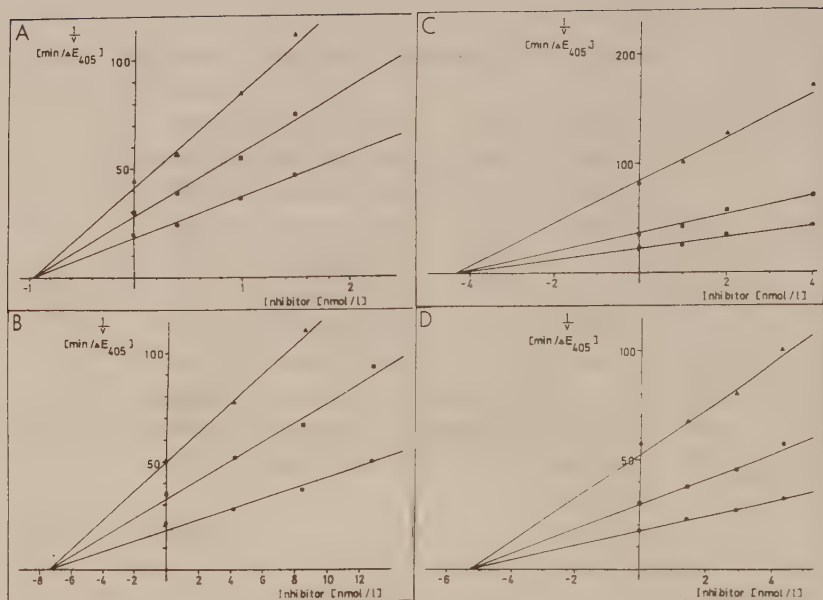


Abb. 12 Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI in der Darstellung nach Dixon (44).

Die Testsysteme zur Messung der Hemmung der Serinproteinasen sind unter 4.2.5 beschrieben.

A) α -Chymotrypsin (1,65 nmol/l)

B) Pankreas-Elastase (15 nmol/l)

C) Humane Leukozyten-Elastase (3,7 nmol/l)

D) Schweine-Leukozyten-Elastase (5,5 nmol/l)

Die angegebenen Enzymkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentrationen im Testsystem.

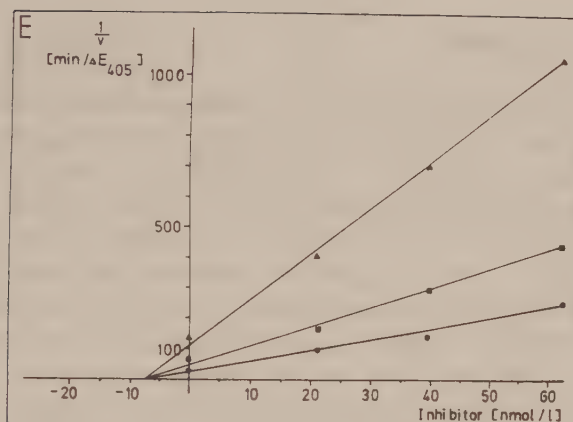
Folgende Substratkonzentrationen wurden im Test eingesetzt:

A) ● 1 mmol/l, ■ 0,1 mmol/l, ▲ 0,05 mmol/l;

B) ● 2 mmol/l, ■ 1 mmol/l, ▲ 0,5 mmol/l;

C) ● 1 mmol/l, ■ 0,1 mmol/l, ▲ 0,01 mmol/l;

D) ● 2 mmol/l, ■ 1 mmol/l, ▲ 0,5 mmol/l;



E) Humanes Cathepsin G (Konzentration im Test: 33 nmol/l).

Folgende Substratkonzentrationen wurden eingesetzt:

● 0,5 mmol/l, ■ 0,25 mmol/l, ▲ 0,1 mmol/l.

Enzym	Substrat	K_M (mol/l) ¹⁾	K_i (mol/l) ²⁾	K_i (mol/l) ³⁾
α_1 -Chymotrypsin (Rind)	Suc(Ala) ₂ ProPheNan	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$3,1 \cdot 10^{-11}$	$9,7 \cdot 10^{-9}$
Pankreaselastase (Schwein)	MeOSuc(Ala) ₂ ProValIle	$2,85 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-10}$	$7,3 \cdot 10^{-9}$
Leukozytelastase (Mensch)	MeOSuc(Ala) ₂ ProValNan	$7,50 \cdot 10^{-5}$	$2,6 \cdot 10^{-10}$	$4,3 \cdot 10^{-9}$
Leukozytelastase (Schwein)	MeOSuc(Ala) ₂ ProValNan	$2,00 \cdot 10^{-3}$	$3,5 \cdot 10^{-11}$	$5,3 \cdot 10^{-9}$
Cathepsin G (Mensch)	Suc(Ala) ₂ ProPheNan	$1,00 \cdot 10^2$	$4,1 \cdot 10^{-10}$	$7,5 \cdot 10^{-9}$

1) nach Lineweaver und Burk, 2) nach Green und Work, 3) nach Dixon

Tab. 5 Kinetische Daten der Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI (vgl. Diskussion Seite 114, 115).

5.5.3 k_{on} -Werte

Zur weiteren Charakterisierung des Hemmechanismus wurden k_{on} -Werte ermittelt. Die Bestimmung erfolgte nach Beatty, Bieth und Travis (67) bei 25°C mit Substraten, die eine empfindliche Messung der Enzymaktivitäten ermöglichen (fluorogene Substrate zur Messung der Elastase-Aktivitäten; SBzl-Substrat zur Messung der Aktivität von α -Chymotrypsin und Cathepsin G). Die Serinproteinasen wurden unterschiedlich lang mit LNPI vorinkubiert. Dabei war zu beachten, daß die molaren Konzentrationen von Enzym und Inhibitor im Test gleich groß waren. Die k_{on} -Werte wurden dann aus der graphischen Darstellung von Rest-Enzymaktivität gegenüber der Zeit (Abb. 13) ermittelt. Sie liegen im Bereich von 10^6 bis 10^7 l/(mol x s) (Tabelle 6).

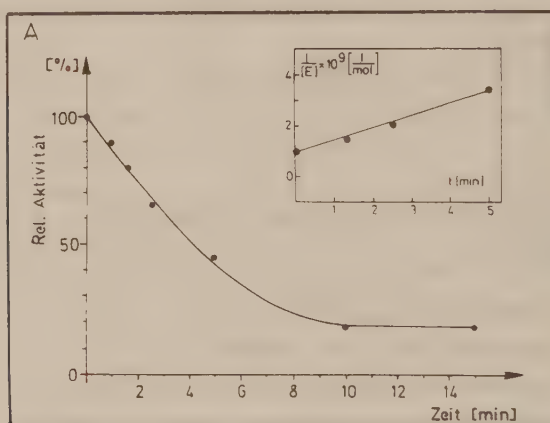
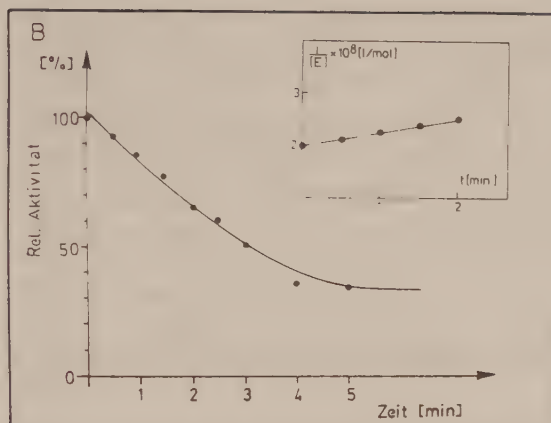
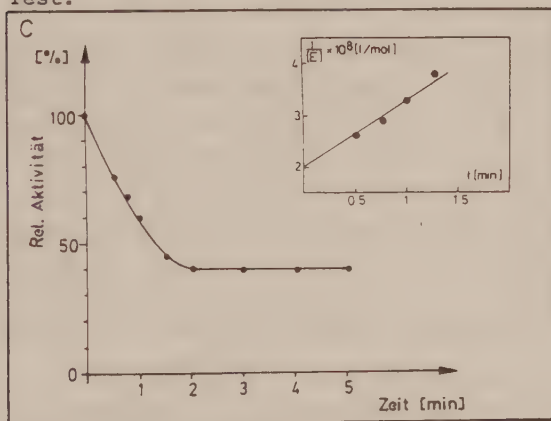


Abb. 13 Bestimmung der Assoziationskonstanten k_{on} der Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI:
a) A: α -Chymotrypsin (1 nmol/l),
LNPI (1 nmol/l), Substrat Suc(Ala)₂ProPheSBzl
(0,1 mmol/l).
Angaben beziehen sich auf Konzentrationen im Test.



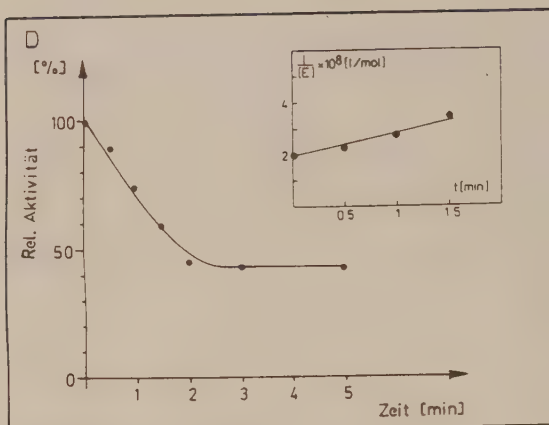
b)B: Pankreas-Elastase (5 nmol/l),
LNPI (5 nmol/l), Substrat MeOSuc(Ala)₂ProValAMC
(0,5 mmol/l).

Angaben beziehen sich auf Konzentrationen im Test.



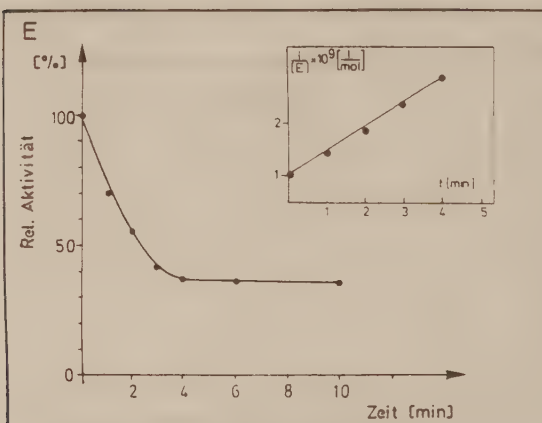
c) C: Humane Leukozyten-Elastase (5 nmol/l),
LNPI (5 nmol/l), Substrat MeOSuc(Ala)₂ProValAMC
(0,5 mmol/l).

Angaben beziehen sich auf Konzentrationen im Test.



d)D: Schweine-Leukozyten-Elastase (5 nmol/l),
LNPI (5 nmol/l), Substrat MeOSuc(Ala)₂ProValAMC
(0,5 mmol/l).

Angaben beziehen sich auf Konzentrationen im Test.



e)E: Humanes Cathepsin G (1nmol/l),
LNPI (1 nmol/l), Substrat Suc(Ala)₂ProPheSBzl
(0,1 mmol/l).

Angaben beziehen sich auf Konzentrationen im Test.

Enzym (Konz. im Test)	Substrat (Konz. im Test)	$k_{on} (M^{-1}sec^{-1})^*$
α -Chymotrypsin, Rind (1 nmol/l)	Suc(Ala) ₂ ProPheSBzl (0,1 nmol/l)	$7,8 \cdot 10^6$
Pankreaselastase, Schwein (5 nmol/l)	MeOSuc(Ala) ₂ ProValAMC (0,5 nmol/l)	$4,2 \cdot 10^5$
Leukozytenelastase, Mensch (5 nmol/l)	MeOSuc(Ala) ₂ ProValAMC (0,5 nmol/l)	$2,3 \cdot 10^6$
Leukozytenelastase, Schwein (5 nmol/l)	MeOSuc(Ala) ₂ ProValAMC (0,5 nmol/l)	$1,5 \cdot 10^5$
Cathepsin G, Mensch (1 nmol/l)	Suc(Ala) ₂ ProPheSBzl (0,1 nmol/l)	$7,4 \cdot 10^6$

* bestimmt nach Zeatty, Bieth und Travis

Tab. 6 k_{on} -Werte der Hemmung von Serinproteinasen durch LNPI.

5.6 Weitere Untersuchungen zum Hemmechanismus des LNPI

Zur weiteren Charakterisierung des Hemmechanismus wurde die Wechselwirkung des Inhibitors mit trägergebundenen Serinproteinasen untersucht. 0,1 mg einer homogenen LNPI-Präparation wurden auf eine mit 0,05 mol/l Tris/HCl, 1 mol/l NaCl, pH 7,4 (Puffer B) äquilibrierte Chymotrypsin-Sepharose-Säule aufgetragen. Die Säule wurde bei einer Flußrate von 0,5 ml/h gespült. Noch während des Spülens mit Puffer B konnte eine Elution von Inhibitorprotein beobachtet werden (Abb. 14).

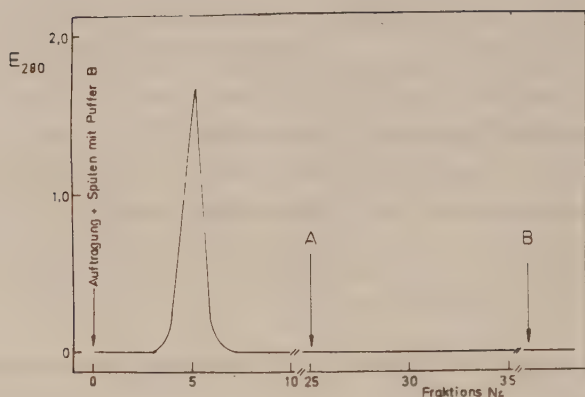


Abb. 14 Affinitätschromatographie von LNPI an α -Chymotrypsin-Sepharose. —, E_{280} .

A) 0,05 mol/l Natriumacetat, pH 4,0, enthält 1 mol/l NaCl; B) 0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,4.

Untersuchungen auf Hemmaktivität gegenüber Chymotrypsin zeigten jedoch, daß das Inhibitorprotein seine Hemmaktivität verloren hatte. Weitere Untersuchungen mittels SDS-PAGE deuten auf eine Modifizierung des Inhibitors hin. So konnte der Verlust eines ca. 3 kDa großen Peptidbruchstückes nachgewiesen werden (Abb. 15).

Zur Dissoziation und Elution eventuell noch gebundenen Inhibitors wurde der Puffer zweimal gewechselt. Zuerst erfolgte eine Elution mit 0,05 mol/l Natriumacetat, 1 mol/l NaCl, pH 4,0, (A) dann wurde mit Puffer B (0,05 mol/l Tris/HCl, pH 7,4) nachgewaschen. Es konnten jedoch keine weiteren Proteine von der Säule unter diesen Bedingungen abgelöst werden (vgl. Abb. 14).

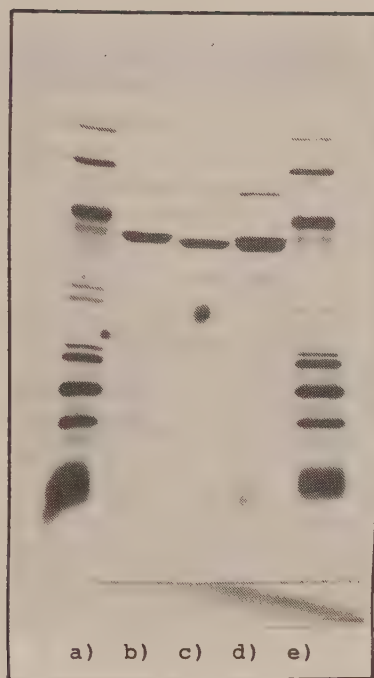


Abb. 15 SDS-PAGE von LNPI unter reduzierenden Bedingungen nach Affinitätschromatographie an Chymotrypsin-Sephrose.

Die Elektrophorese wurde wie unter 4.2.1 beschrieben durchgeführt.

a) und e) Molekulargewicht-Standards

(vgl. Abb. 4);

b) LNPI (0,005 mg);

c) LNPI (0,005 mg) nach Elution von Chymotrypsin-Sephrose;

d) Mischung äquimolarer Mengen von nativem und affinitätschromatographiertem LNPI.

Zusätzlich wurden äquimolare Mengen von LNPI und Chymotrypsin 15 min bei 25°C inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde unter reduzierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE

aufgetrennt. Der gebildete Komplex zwischen LNPI und Chymotrypsin konnte dabei nachgewiesen werden (Abb. 16). Der Nachweis eines eventuell freigesetzten Peptids von 3 kDa war unter den gewählten Elektrophoresebedingungen nicht möglich (vgl. Diskussion).

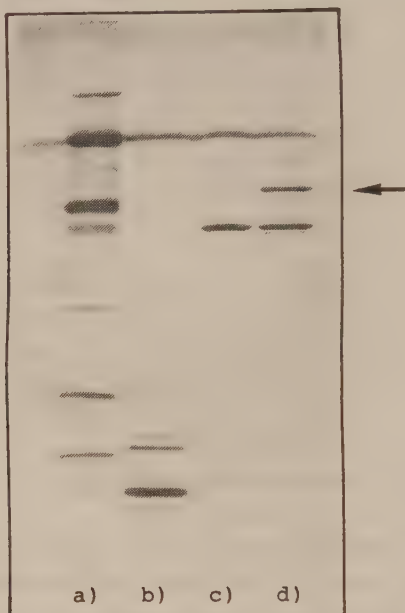


Abb. 16 SDS-Elektrophorese von LNPI, α -Chymotrypsin und LNPI- α -Chymotrypsin-Komplex unter reduzierenden Bedingungen.

Die Elektrophorese wurde wie unter 4.2.1 beschrieben durchgeführt.

a) Molekulargewicht-Standards (vgl. Abb. 4).

b) α -Chymotrypsin (0,001 mg).

c) LNPI (0,0016 mg).

d) LNPI und α -Chymotrypsin (←: LNPI- α -Chymotrypsin-Komplex).

5.7 Immunologische Untersuchungen

5.7.1 Immunologische Charakterisierung von LNPI

Gewinnung von Antiseren

Antikörper gegen LNPI wurden in Kaninchen erzeugt. Der Anstieg des Antikörper-Titers während der Immunisierung wurde mittels Enzymimmunoassay verfolgt. Nach 4 Wochen war ein konstanter Titer von $T = 26,5$ mg/ml erreicht, so daß die Kaninchen entblutet werden konnten. Zur Charakterisierung der Antiseren wurden Elektroimmundiffusionsexperimente (Rocketimmunelektrophoresen) (Abb. 17) und Immunelektrophoresen (Abb. 18) durchgeführt.

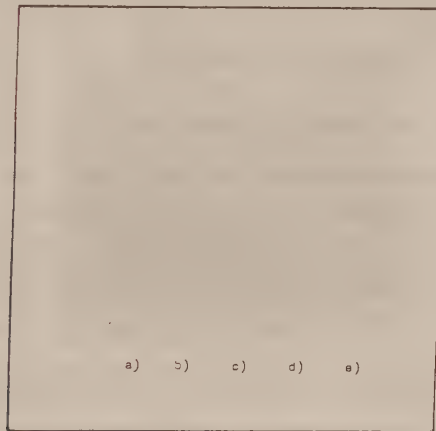


Abb. 17 Elektroimmundiffusion nach Laurell (59) in 1 % (w/v) Agarose.

Antiserumgehalt des Gels: 1 % (v/v) Kaninchen-Antiserum; LNPI-Mengen in: a) 0,02 mg, b) 0,015 mg, c) 0,01 mg, d) 0,005 mg, e) 0,001 mg.

Isolierung der Gesamt-IgG-Fraktion

Die Gesamt-IgG-Fraktion wurde aus den Antiseren durch Oktansäure-Fällung isoliert. Die Ausbeute betrug dabei 3,35 mg/ml Antiserum. Zur Charakterisierung der gewonnenen Antikörper wurden Immunelektrophoresen (Abb. 18) angefertigt.

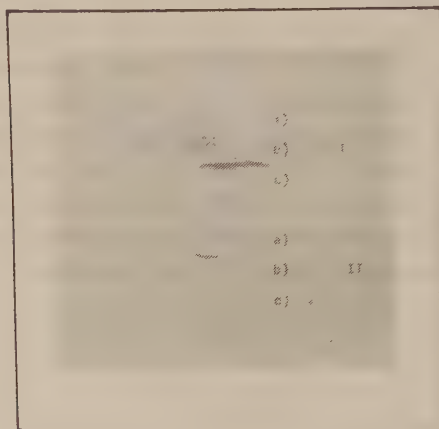


Abb. 18 Immunelektrophorese der anti-LNPI-IgG-Fraktion vom Kaninchen (a) und von Kaninchen-Vollserum (c). b)I: anti-Kaninchenserum IgG vom Esel; b)II: anti-Kaninchen Immunglobulin G IgG von der Ziege.

Darstellung immunselektierter anti-LNPI-Immunglobulin G

Aus den LNPI-Antiseren wurden die spezifischen LNPI-Antikörper mit Hilfe von LNPI-Sepharose isoliert. Die Ausbeute betrug 1,95 mg spezifische Antikörper/ml Antiserum. Der Titer der erhaltenen immunselektierten Antikörperlösung wurde mit Pansorbin A^R zu 0,048 mg/ml bestimmt (vgl. Abb. 19). Die Antikörperlösung hatte einen Proteingehalt von 0,19 mg/ml.

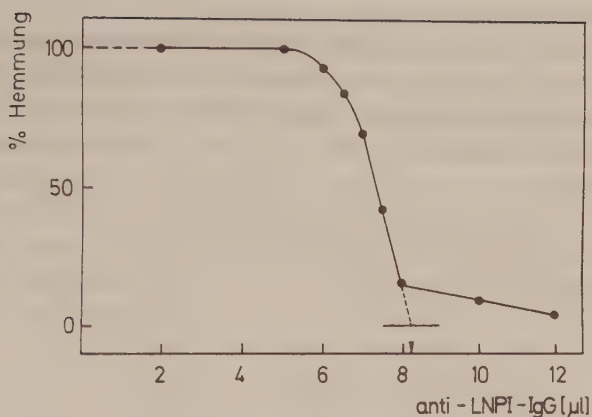


Abb. 19 Titerbestimmung einer anti-LNPI Immunglobulin G-Lösung mittels Pansorbin A^R. Die Titerbestimmung wurde wie unter 4.2.14.5 beschrieben durchgeführt.

Untersuchungen zur Kreuzreaktion von LNPI mit anderen Proteinen

Die isolierte anti-LNPI-IgG-Fraktion wurde hinsichtlich der Kreuzreaktion mit anderen Proteinen untersucht. Dazu wurden Western Blot-Analysen und ein Enzymimmunoassay für LNPI (vgl. Seite 92-97) durchgeführt. Infolge der bei der Charakterisierung von LNPI beobachteten Ähnlichkeit mit α_1 -Proteinase-Inhibitor (Hemmspektrum, blockierte N-terminale Aminosäure, Homologien in der Aminosäurezusammensetzung, ähnlicher Hemmechanismus und k_{on} -Werte der gleichen Größenordnung), war von besonderem Interesse, ob eine Kreuzreaktion mit α_1 -Proteinase-Inhibitor aus Schweineserum zu beobachten war. Dazu wurden LNPI und α_1 -Proteinase-Inhibitor vom Schwein nach SDS-Elektrophorese auf Nitrocellulose transferiert und mit einer anti-LNPI-IgG-Lösung vom Kaninchen inkubiert.

Die Detektion erfolgte mit goldmarkierten Immunglobulin G von der Ziege, die gegen Kaninchen-IgG gerichtet waren. Die Auswertung des Transblots zeigte keine Kreuzreaktion von Schweine α_1 -Proteinase-Inhibitor mit anti-LNPI-Antikörpern (Abb. 20).



Abb. 20 Western Blot Analyse von LNPI und α_1 -Proteinase-Inhibitor des Schweins. Die Detektion erfolgte mit anti-LNPI-IgG vom Kaninchen.

A) α_1 -PI vom Schwein (0,001 mg).

B) LNPI (0,001 mg).

C) Molekulargewicht-Standards.

Desweiteren wurde die Kreuzreaktion zwischen Schweine- und Rinder-LNPI (68) untersucht. Dazu wurden Rinder- und Schweine-LNPI nach SDS-Elektrophorese auf Nitrocellulose transferiert und mit anti-LNPI-IgG vom Kaninchen inkubiert. Die Anfärbung erfolgte ebenfalls mit goldmarkierten Immunglobulin G von der Ziege, die gegen Kaninchen-IgG gerichtet sind. Die Auswertung des Blots ergab eine schwache Kreuzreaktion von anti-Schweine LNPI-IgG mit Rinder LNPI (Abb. 21).

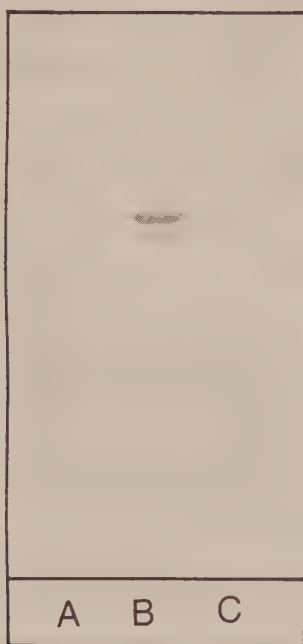


Abb. 21 Western Blot-Analyse von Schweine- und Rinder-LNPI. Die Detektion erfolgte mit anti-LNPI-IgG vom Kaninchen.

A) Molekulargewichtstandards.

B) LNPI vom Schwein (0,001 mg).

C) LNPI vom Rind (0,001 mg).

5.7.2 LNPI Enzymimmunoassay

Zur Quantifizierung von LNPI in biologischen Proben (z.B. Schweineplasma) wurde ein Enzymimmunoassay entwickelt, dessen Prinzip in Abb. 22 dargestellt ist. Dazu wurden LNPI-spezifische Antikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden. In einem zweiten Reaktionsschritt erfolgte die Bindung von LNPI an die Oberflächen-fixierten Antikörper. Die Detektion des gebundenen LNPI's wurde über ein anti-LNPI-IgG-Peroxidase-Konjugat durchgeführt.

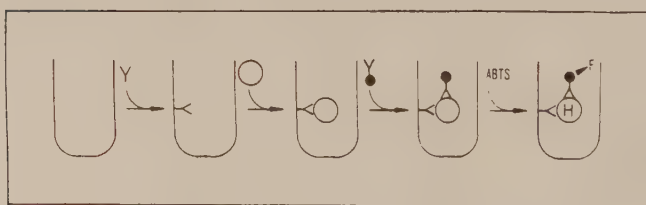


Abb. 22 Schema des Enzymimmunoassays für LNPI nach dem Sandwich-Prinzip.

Zur Optimierung des Enzymimmunoassays mußten folgende Parameter verändert werden:

- die Konzentration der IgG-Lösung, die zur Oberflächenbeschichtung der Mikrotiterplatte verwendet wurde,
- die Konzentration des Immunglobulin G-Enzym-Konjugats,
- die Inkubationszeiten der Ansätze bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.

Die Durchführung des Enzymimmunoassays war nach erfolgter Optimierung unter den in Tabelle 7 zusammengefaßten Bedingungen möglich

	Probe (ml)	Blindwert (ml)
Anti-LNPI-IgG (2 mg/l)	0,20	0,20
	15 h bei 4°C	
LNPI-Standard oder Probe	0,20	-
Puffer C	-	0,20
	15 h bei 4°C	
Anti-LNPI-IgG Peroxidase-Konjugat (Verdünnung 1 : 200)	0,20	0,20
	3 h bei 37°C	
Substrat-Lösung	0,20	0,20
	30 min bei 37°C	
	Messung der Absorption bei 405 nm	

Tab. 7 Pipettierschema des LNPI Enzymimmunoassays.

Unter den optimierten Bedingungen wurde eine LNPI-Standardkurve erhalten, die in Abb. 23 dargestellt ist. Die Standardisierung der LNPI-Lösung erfolgte durch Aminosäureanalyse. Der Meßbereich der Kurve lag zwischen 0,5 und 10 ng/ml LNPI. Der Intraassay-Koeffizient lag zwischen 3 bis 6 %; der Interassay-Koeffizient zwischen 6 bis 12 %. Die Wiederfindung von LNPI im Schweineplasma mittels LNPI-Enzymimmunoassay lag bei 100 %.

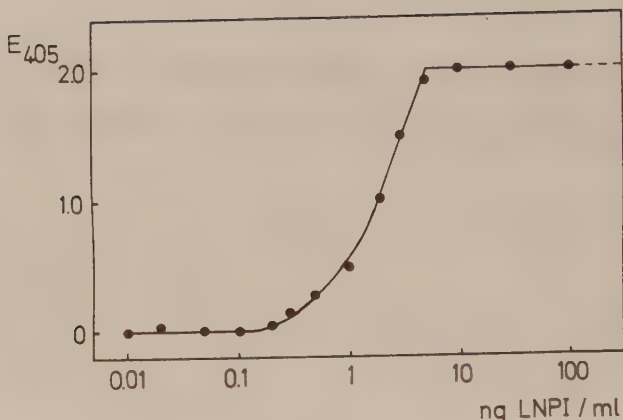


Abb. 23 Bindungskurve von LNPI im LNPI-Enzymimmunoassay.

Unter Verwendung des entwickelten Enzymimmunoassays konnte zusätzlich zur Western Blot-Analyse (vgl. Seite 92, 93) noch eine weitere Methode zur Untersuchung der Kreuzreaktion anderer Proteinen mit LNPI eingesetzt werden.

Nach Applikation von Schweine α_1 PI in den LNPI-Enzymimmunoassay konnte keine Bindung von α_1 PI im Test beobachtet werden.

Um das erhaltene Ergebnis weiter abzusichern, wurde der Enzymimmunoassay etwas modifiziert. So wurde zur Beschichtung der Mikrotiterplatten statt der anti-LNPI-IgG ein anti- α_1 PI-Immunglobulin G vom Kaninchen verwendet; die Detektion erfolgte wiederum mit einem anti-LNPI-IgG-Peroxidase-Konjugat. Auch unter diesen Bedingungen konnte keine Bindung von α_1 PI im Assay beobachtet werden. Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen wurden somit auch durch enzymimmunologische Untersuchungen bestätigt, d.h. α_1 PI vom Schwein reagiert mit Antikörpern gegen Schweine-LNPI nicht kreuz.

Wurde LNPI vom Rind im Schweine-LNPI-Enzymimmunoassay eingesetzt, so konnte eine schwache Bindung beobachtet werden, die aber unter 1 % der Bindung des Schweine-LNPI lag (Abb. 24).

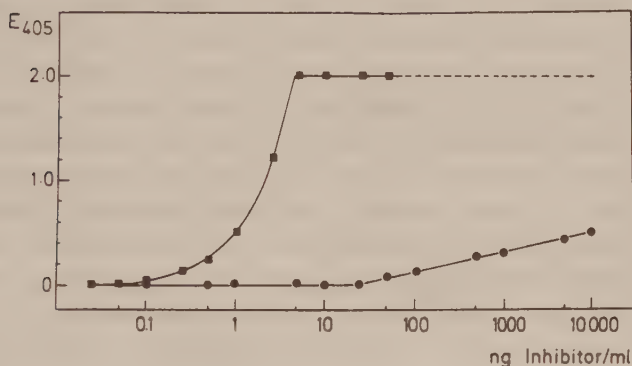


Abb. 24 Bindungskurve des LNPI vom Schwein (■) im LNPI-Sandwich-Enzymimmunoassay. (●) LNPI vom Rind.

5.7.3 LNPI Biolumineszenz Enzymimmunoassay

Zur Messung sehr geringer LNPI-Konzentrationen in tier-experimentellen Studien wurde ein hoch empfindlicher kompetitiver Biolumineszenz-Enzymimmunoassay entwickelt. Das Schema des Tests ist in Abb. 25 dargestellt.

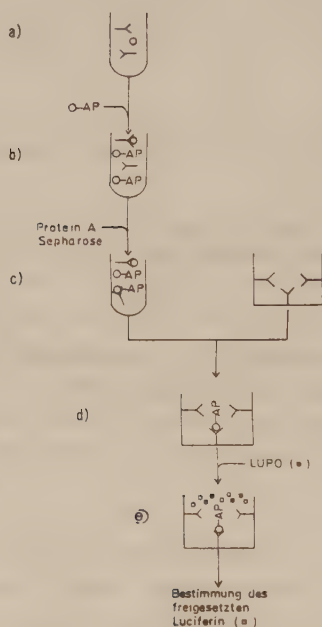


Abb. 25 Schema des kompetitiven Biolumineszenz-Enzymimmunoassays.

Eine konstante Menge an immunselektierten anti-LNPI-IgG (vgl. 5.6.1) wurde mit abnehmenden Konzentrationen an LNPI vorinkubiert (Abb. 25 a). In einem zweiten Inkuba-

tionsschritt werden die freien Antikörperbindungsstellen mit einer konstanten Menge LNPI-alk. Phosphatase-Konjugat abgesättigt (Abb. 25 b). Als nächster Schritt erfolgte die Bindung von Antikörper-LNPI-Komplexen bzw. Antikörper-LNPI-alk. Phosphatase-Konjugat an Protein A-Sepharose. Durch Abzentrifugieren wurden die gebundenen Komplexe aus der Lösung entfernt (Abb. 25 c). Der Überstand, der noch ungebundenes LNPI-alk. Phosphatase-Konjugat enthielt, wurde auf eine mit anti-LNPI-IgG beschichtete Mikrotiterplatte gegeben (Abb. 25 d). Die Konjugat-Moleküle wurden im nächsten Inkubationsschritt an die Oberflächen-fixierten anti-LNPI-IgG der Mikrotiterplatte gebunden. Nach Zugabe von Luciferin-O-Phosphat als Substrat, wurde das durch LNPI-alk. Phosphatase-Konjugat freigesetzte D-Luciferin (*Photinus pyralis*) mit Hilfe von Luciferase, ATP und Sauerstoff bioluminometrisch bestimmt (Abb. 25 e).

Zur Entwicklung des Biolumineszenz-Enzymimmunoassays mußten folgende Parameter untersucht und optimiert werden:

- Konzentration (Titer) der immunselektierten anti-LNPI-IgG-Lösung im Test,
- Konzentration der LNPI-Lösung,
- Konzentration des LNPI-alk. Phosphatase-Konjugates,
- Konzentration der anti-LNPI-IgG-Lösung zur Oberflächenbeschichtung der Mikrotiterplatte,
- Dauer der Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen.

Die Ergebnisse der Optimierungsversuche sind in Tabelle 8 zusammengefaßt:

Tab. 8 Optimierte Bedingungen für den kompetitiven
LNPI Biolumineszenz-Enzymimmunoassay:

a) Vor-Inkubationen in Eppendorf-Reaktionsgefäßen:

Inkubationsansatz	Probe (ml)	Blindwert (ml)
Immunselektierte Anti- LNPI-IgG-Lsg. (20 pg/ml)	0,05	-
Puffer C	-	0,05
LNPI-Standard (0,005 bis 100 pg/ml) oder Probe	0,05	-
Puffer C	-	0,05
8 h bei 4°C		
LNPI-alk.Phosphatase-Konjugat (Verdünnung 1 : 500)	0,05	-
Puffer C	-	0,05
Protein A-Sepharose (50 mg/ml in Puffer C)	0,01	0,01
12 h bei 4°C		
Puffer C	0,06	0,06

Die Ansätze wurden 10 min bei 10 000 x g abzentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden auf die Mikrotiterplatte transferiert.

b) Inkubationen auf der Mikrotiterplatte:

	Probe (ml)	Blindwert (ml)
Anti-LNPI-IgG (2 mg/l)	0,20	-
Puffer A	-	0,20
	12 h bei 4°C	
2 % (w/v) BSA in Puffer A	0,20	0,20
	3 h bei 4°C	
Überstand der abzentri- fugierten Inkubationsansätze	0,20	-
Puffer C	-	0,20
	3 h bei 4°C	
Substrat-Lösung	0,20	-
DEA-Puffer	-	0,20
	30 min bei 37°C	

Für die Bestimmung des freigesetzten Luciferins wurde ein optimiertes Detektionssystem (64) verwendet (vgl. 4.2.14.9).

Unter diesen Bedingungen wurde die in Abb. 26 dargestellte Bindungskurve erhalten. Der für LNPI entwickelte Biolumineszenz-Enzymimmunoassay erbrachte eine Steigerung der Empfindlichkeit gegenüber dem Enzymimmunoassay um den Faktor 1000. Die untere Nachweisgrenze für LNPI lag im Biolumineszenz-Enzymimmunoassay bei 0,5 pg/ml. LNPI-Konzentrationen von 0,5 bis 50 pg/ml konnten noch gemessen werden. Der Intraassay-Koeffizient lag bei 2 bis 4 %, der Interassay-Koeffizient zwischen 4 und 10 %. Die Wiederfindung von LNPI im Biolumineszenz-Enzymimmunoassay wurde zu 90 % bestimmt.

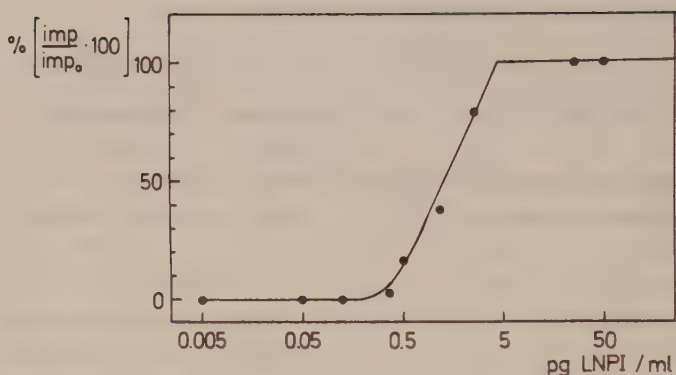


Abb. 26 Bindungskurve von Schweine LNPI im Biolumineszenz-Enzymimmunoassay für LNPI.

5.8 Elektronenmikroskopische Lokalisation des Inhibitors

Zur immunohistologischen Lokalisation des Inhibitors wurden die gewonnenen Leukozyten mit Glutardialdehyd fixiert. Es erfolgte keine Nachfixierung mit OsO_4 , um die Antigenstrukturen zu erhalten. Wie aus Abb. 27 ersichtlich ist, enthielt die Leukozytenpräparation überwiegend Granulozyten. Sie sind deutlich an ihren segmentierten Kernen sowie den Granula im Cytoplasma erkennbar. Die Zellen zeigen die für Granulozyten typische kugelige Form. Auf der Außenseite sind nur wenige kurze Pseudopodien zu sehen. Aufgrund der schonenden Fixierung sind Membranen, Golgi-Apparat und Mitochondrien nur schwer erkennbar. In der Mitte der rechten Bildhälfte ist ein Monozyt zu erkennen.

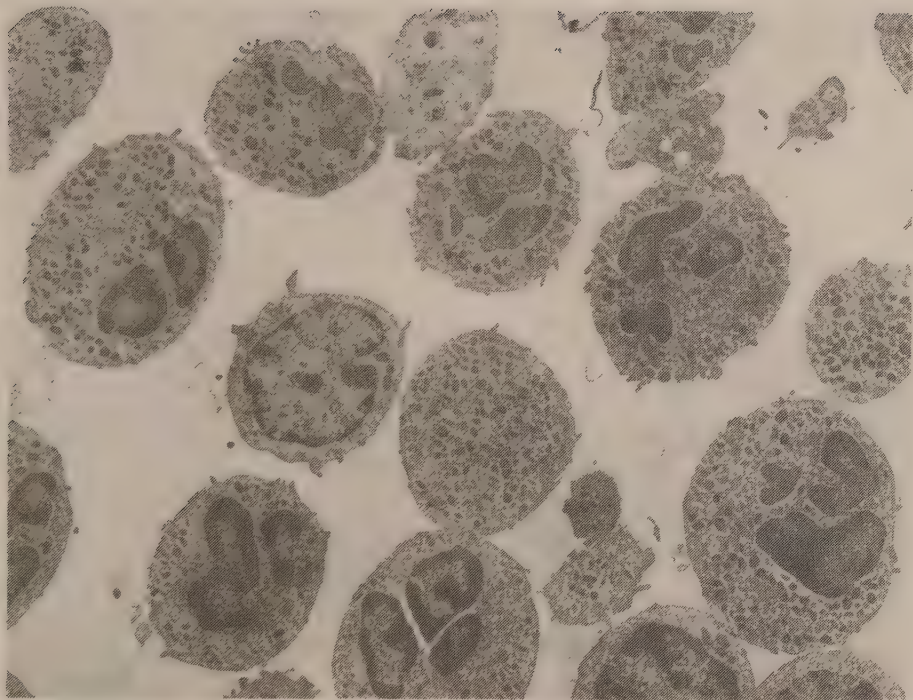


Abb. 27 Elektronenmikroskopische Aufnahme der Leuko-
zytenpräparation (Vergr. 5700 x)

Nach Inkubation mit LNPI-Antiserum und Protein A-Gold-
lösung konnte LNPI in den Granula nachgewiesen werden
(Abb. 28 und 29).

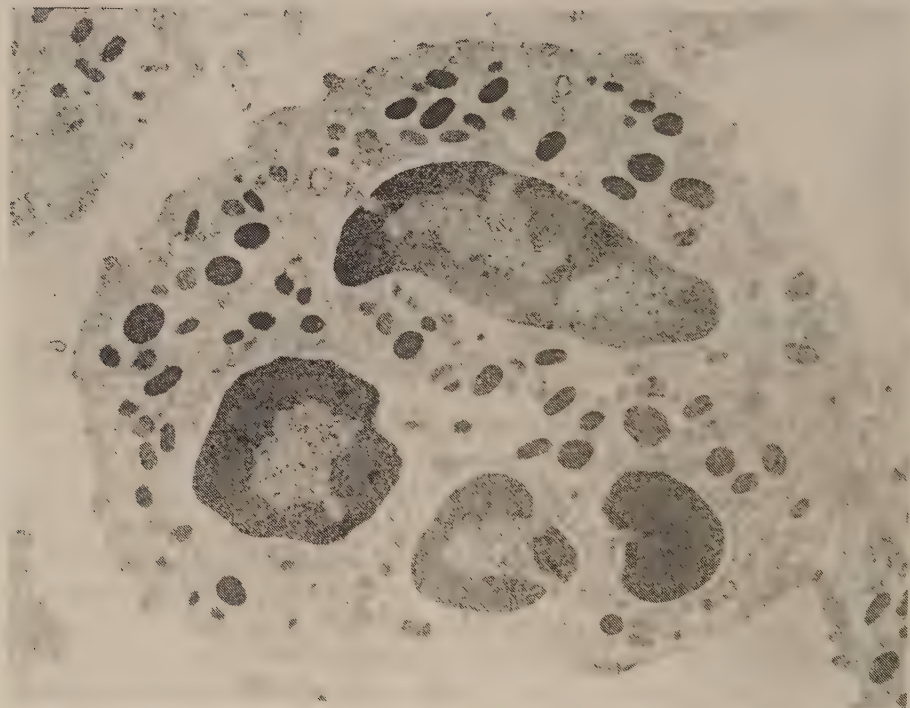


Abb. 28 Immunhistologische Lokalisierung von LNPI in Granulozyten (Antiserum-Verdünnung 1 : 500; Vergr. 25 000 x).

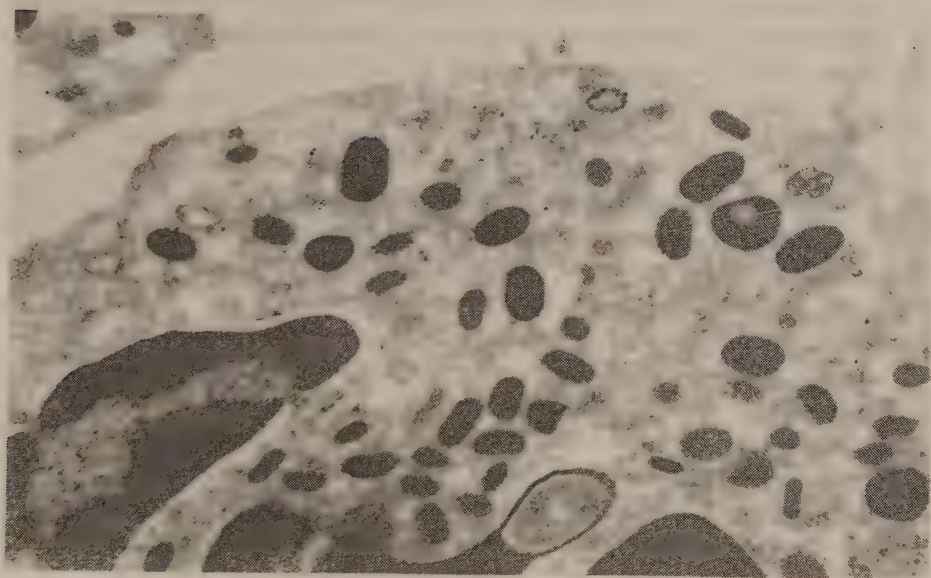


Abb. 29 Immunhistologische Lokalisierung von LNPI in
Granulozyten (Antiserum-Verdünnung 1 : 1000;
Vergr. 70 000 x).

5.10 Studien zur Pathobiochemie des LNPI

Mit Hilfe der entwickelten Immunoassays (vgl. 4.2.14.8 und 4.2.14.9) wurden die Konzentrationen des LNPI in Schweine-Leukozyten, im Schweineplasma vor und während Eintritt einer Sepsis, sowie im Überstand von Leukozyten-Suspensionen nach Stimulation (z.B. mit Zymosan) bestimmt.

Zur Messung des LNPI-Gehalts (freier LNPI und möglicherweise Enzym- gebundener LNPI) in Schweine-Leukozyten wurde die Gesamt-Leukozytenzahl mittels Coulter Counter ermittelt, nach erfolgtem Aufschluß der Leukozyten (siehe 5.1.1) und Präparation des Cytosols wurde der LNPI-Gehalt mittels Enzymimmunoassay bestimmt. Es ergab sich unter Berücksichtigung der Verdünnung des Cytosolvolumens ein Wert von 64×10^{-12} mg (= 64 fg) LNPI/Leukozyt.

Desweiteren wurden an einem etablierten Sepsis-Schock-Modell des Schweins (66) LNPI-Spiegel im Blut der Tiere gemessen. Unter physiologischen Bedingungen konnte der LNPI-Gehalt im Plasma zu 130 ± 20 ng LNPI/ml Blut bestimmt werden. Wurden Plasmen von Schweinen untersucht, bei denen durch intravenöse Injektion von E.coli Zellen eine Sepsis hervorgerufen worden war, konnte eine starke Zunahme des LNPI-Gehalts gemessen werden. Der Anstieg des LNPI-Spiegels im Plasma der Tiere verlief parallel zum zeitlichen Verlauf der Sepsis. Es wurden maximale Wert von bis zu 1600 ng LNPI/ml Plasma erreicht. Bei den Tieren, die die Sepsis überlebten, ging der LNPI-Spiegel im Plasma wieder auf den Normal-Wert zurück (siehe Abb. 30).

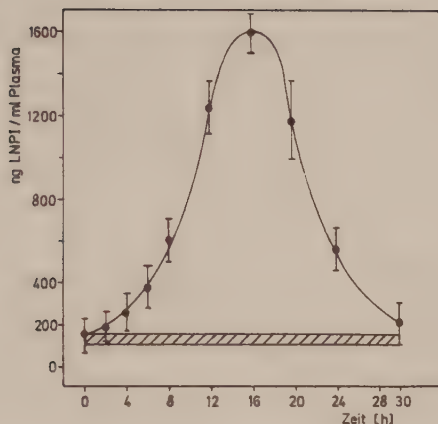


Abb. 30 Mittelwerte der LNPI-Konzentrationen im Schweineplasma. ▨ : LNPI-Konzentrationen in normalen, nicht-septischen Schweine-Plasmen (Mittelwert aus 10 Bestimmungen). ● : mittlerer LNPI-Gehalt in Schweine-Plasmen (n = 18) im Verlauf einer *E. coli* Sepsis.

Neben den *in vivo* Untersuchungen am Sepsis-Modell des Schweine wurde auch die Stimulation der Leukozyten mit Endotoxin, *E.coli* und Zymosan *in vitro* durchgeführt. Zunächst wurde die Lebensdauer der Leukozyten unter *in vitro* Bedingungen ohne Stimulation studiert. Als Marker für die Integrität der Leukozyten wurde die Lactatdehydrogenase-Aktivität gewählt, die im Zellüberstand bestimmt wurde. Es zeigte sich, daß im Vollblut über 24 Stunden eine kontinuierliche Desintegration der Leukozyten stattfindet, während diese bei den isolierten Leukozyten erst nach 8 Stunden beginnt (Abb. 31).

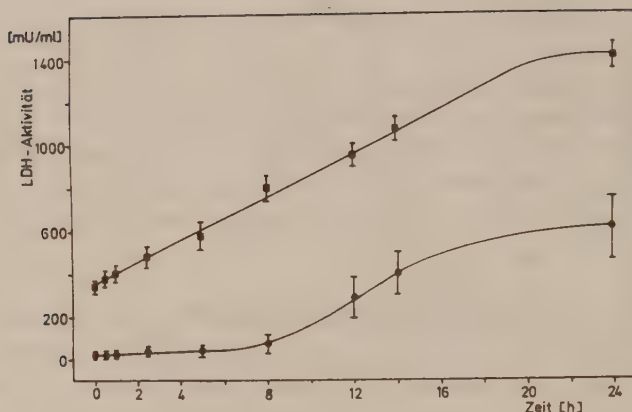


Abb. 31 Freisetzung von LDH aus Leukozyten bei 37⁰C innerhalb von 24 h (6 Bestimmungen).

■: Heparin-Vollblut

●: Isolierte Leukozyten in physiologischer Kochsalzlösung suspendiert.

Unter Berücksichtigung der spontanen Desintegration der Leukozyten wurden in weiteren Untersuchungen die nach Stimulation mit Endotoxin, E. coli und Zymosan erfolgte Desintegration der Leukozyten gemessen. Es zeigte sich, daß die Zunahme des LNPI-Spiegels mit zunehmender Desintegration der Leukozyten korreliert. Die drei Stimulationsreagentien waren unter den gewählten Bedingungen unterschiedlich wirksam. Sowohl im Vollblut als auch bei den isolierten Leukozyten erwies sich Zymosan als die am wirksamste Substanz. Am wenigsten wirksam war Endotoxin (Abb. 32).

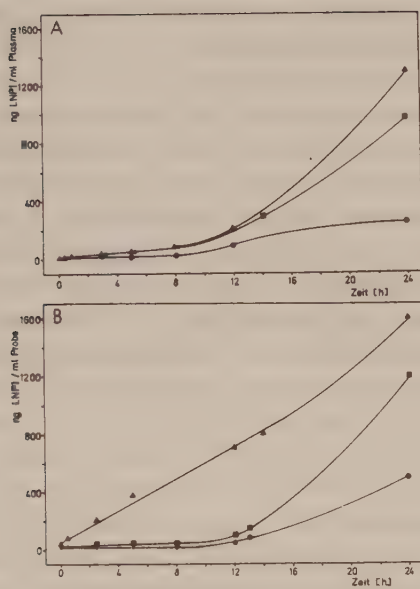


Abb. 32 LNPI-Konzentration im Schweine Vollblut (A) und im Überstand isolierter Leukozyten (B). Stimulation mit Zymosan (▲) (1,16 mg/ml), E.coli-Suspension (■) (1×10^6 Zellen) und Endotoxin (●) (10 ug/ml). (Versuchsbedingungen siehe 4.2.16).

6. Diskussion

Biologisches Ausgangsmaterial

Das angewandte Verfahren zur Isolierung der Leukozyten ist als ein besonders schonendes Verfahren in der Literatur beschrieben worden (24). Dies zeigte sich auch in der Beschaffenheit der Leukozyten-Fraktion nach lichtmikroskopischer Betrachtung. Die Intaktheit der Zellen nach der Isolierung konnte ferner auch mittels Lactat-Dehydrogenase-Bestimmung (siehe 4.2.3.8) gezeigt werden. Die Präparation bestand zu über 90 % aus mit Zymosan sehr gut stimulierbaren Granulozyten.

Isolierung des LNPI

Im erhaltenen Schweineleukozyten-Cytosol wurden Hemmaktivitäten gegenüber α -Chymotrypsin, Leukozyten-Elastase und Trypsin gefunden (vgl. 5.1.2). Das Hemmpotential gegenüber den verschiedenen Proteinasen war allerdings unterschiedlich. So wurden im Vergleich zur Hemmaktivität von Chymotrypsin- und Leukozyten-Elastase gegenüber Trypsin geringere Hemmaktivität gefunden (α -Chymotrypsin: 0,6 IU/ml, Leukozyten-Elastase: 0,07 IU/ml, Trypsin: 0,007 IU/ml).

Nach Gelfiltration des Cytosols wurde keine Trypsin-hemmung mehr gefunden, während die Chymotrypsin- und Elastase-Hemmaktivitäten parallel eluiert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß im Cytosol mindestens zwei unterschiedliche Inhibitoren vorliegen, von denen der eine Elastase und Chymotrypsin-ähnliche Enzyme, der andere Trypsin-ähnliche Enzyme hemmt. Damit wurden die Beobachtungen von Kopitar et al. (21) bestätigt, die mindestens zwei Inhibitoren im Cytosol von Schweine-

Leukozyten beschrieben hat. Während der Gelfiltration wird der Trypsin-Inhibitor anscheinend durch die Elution so verdünnt, daß ein Nachweis mit dem angewandten Testsystem für Trypsin auf Grund der ohnehin schon geringeren molaren Hemmaktivität im Vergleich zum Elastase/Chymotrypsin-Inhibitor in den Fraktionen nicht mehr möglich ist.

Die Elastase-Hemmaktivität lag nach der Gelfiltration im Vergleich zur Hemmaktivität im Cytosol um ca. 30 % niedriger, während die Chymotrypsin-Hemmaktivität konstant blieb. Auf Grund der ähnlichen Eigenschaften von LNPI und α_1 PI ist es möglich, daß auch LNPI im reaktiven Zentrum ebenso wie α_1 PI ein oxidierbares Methionin besitzt. Während der Gelfiltration kann es möglicherweise zu einer teilweisen Oxidation dieser Aminosäure kommen, wodurch das Hemmverhalten beeinflußt wird. Am Beispiel des α_1 PI konnte gezeigt werden, daß die Oxidation des Methionin zu einer Abnahme der Elastase-Hemmaktivität führt, während die Chymotrypsin-Hemmaktivität nicht beeinflußt wird (69). Während der FPLC-Chromatographie war kein weiterer Abfall der Hemmaktivitäten mehr festzustellen; Chymotrypsin- und Elastase-Hemmaktivität wurden weiterhin parallel von den Säulen eluiert.

Reinheit der LNPI Präparation

Die Untersuchungen auf Einheitlichkeit mittels SDS-PAGE nach der ersten FPLC-Ionenaustauscher-Chromatographie zeigten, daß die Inhibitorpräparation noch nicht homogen war. Aus diesem Grund wurde zusätzlich ein weiterer FPLC-Ionenaustauscher-Chromatographie-Schritt mit einem engeren pH-Gradienten zur Reinigung von LNPI angewendet. Nach dieser Chromatographie konnte der Inhibitor mit hoher Reinheit erhalten werden.

Bei der quantitativen N-terminalen Aminosäuresequenzierung konnte mit einer Menge an Inhibitor, die um das 10fache über der berechneten Nachweisgrenze einzelner Aminosäuren lag, keine Aminosäure nachgewiesen werden. Dies zeigt einerseits die Homogenität der Präparation, andererseits deutet dieser Befund auf eine Blockierung der N-terminalen Aminosäure hin. Die Unzugänglichkeit für den Edman-Abbau am N-terminalen Ende eines Proteins oder Peptids läßt sich einmal mit einer Acylierung der NH_2 -Gruppe erklären. Zum anderen kann eine aminoendständige Glutaminsäure ebenfalls zu einer Blockierung führen, da sich aus dem Glutaminsäurerest während der Isolierung durch Zyklisierung Pyroglutaminsäure bilden kann; Pyroglutaminsäure kann mit Phenylisothiocyanat beim Edman-Abbau nicht umgesetzt werden (70). Beim humanen und beim Schweine α_1 -Proteinase Inhibitor wurde beispielsweise eine Blockierung des N-Terminus durch eine Pyroglutaminsäure nachgewiesen (15,71).

Chemische und physikochemische Eigenschaften

Die Molekülmasse wurde neben der SDS-PAGE auch mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt. Der Inhibitor konnte im Bereich von 40 kDa von einer Sephadex G-75 superfine Säule eluiert werden. In der SDS-PAGE ergab sich unter reduzierenden Bedingungen eine Proteinbande, die der selben Molekülmasse zugeordnet werden konnte. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen kam es beim LNPI zur Ausbildung von höhermolekularen Aggregaten. Möglicherweise kann dies über intermolekulare S-S-Brücken geschehen, da insgesamt 3 Cysteinreste pro LNPI-Molekül nachgewiesen werden konnten, von denen aber nur ein Cystein-Rest unter nicht reduzierenden Bedingungen zugänglich ist.

In der isoelektrischen Fokussierung unter denaturierenden Bedingungen (9 mol/l Harnstoff) traten mehrere Proteinbanden im pH-Bereich zwischen 7,0 und 7,5 auf. Dieses Verhalten von in der SDS-PAGE einheitlichen Proteinen kann durch einen unterschiedlichen Glykosilierungsgrad erklärt werden, wie es beispielsweise beim α_1 PI vom Schwein (71) und α_1 PI vom Mensch (72) beobachtet wurde. Der Nachweis, daß LNPI oxidierbare Kohlehydratreste trägt, wurde durch Anfärbung mit Dansylhydrazin erbracht (vgl. 5.3).

Die pH-Abhängigkeit der Hemmaktivität von LNPI zeigt, daß der Inhibitor im neutralen pH-Bereich voll aktiv ist. Im sauren pH-Bereich ($< \text{pH } 5,0$) ist wie beim α_1 PI (5) eine Inaktivierung nachweisbar.

Zur Berechnung der Aminosäurezusammensetzung wurde eine Molekularmasse von 40 kDa zu Grunde gelegt. Da der Inhibitor Kohlehydratreste enthält und außerdem die Aminosäuren Prolin und Tryptophan nicht bestimmt wurden, kann die Zusammensetzung nur als vorläufig betrachtet werden. Trotzdem zeigt ein Vergleich der Aminosäurezusammensetzung von LNPI (siehe Tabelle 4) mit α_1 PI von Schwein (71) und Mensch (73,74) zahlreiche Ähnlichkeiten. Die drei Proteine enthalten im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren hohe Anteile an den sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Auch der Anteil an der basischen Aminosäure Leucin hebt sich deutlich von den Anteilen der anderen Aminosäuren ab. LNPI enthält 10 Methionin-Reste, α_1 PI von Mensch und Schwein enthalten jeweils 8 Methioninreste. Der Vergleich der Cystein-Reste zeigt jedoch Unterschiede: α_1 PI vom Mensch enthält **einen** Cystein-Rest (73, 74), α_1 PI vom Schwein vermutlich keinen Cystein-Rest (71) und beim LNPI wurden **drei** Cystein-Reste gefunden. Dies erklärt vermutlich auch, daß beim Schweine- α_1 PI keine Ausbildung von höhermoleku-

laren Aggregaten beobachtet wurde (71).

Ein Sequenzvergleich der zur Verfügung stehenden Sequenzdaten von LNPI mit bekannten Sequenzen ergab Homologien zu humanem α_1 PI (75), Antithrombin III (76) und Ovalbumin (77). Homologien zwischen Ovalbumin und humanem α_1 PI sind schon länger bekannt. Man ordnet diese beiden Proteine zusammen mit Antithrombin III den Serpinen zu (78). Es liegt somit die Vermutung nahe, daß auch LNPI zu dieser Protein-Familie gehört.

Hemmkinetische Untersuchungen

Ein Vergleich der bei den Ermittlungen der Titrationskurven eingesetzten molaren Enzymkonzentrationen mit der verbrauchten Inhibitormenge ergab, daß sich am Äquivalenzpunkt ein äquimolarer Komplex (1 : 1 Komplex) ausbildet. Zur Berechnung der molaren Konzentrationen der Enzyme wurden die Ergebnisse der jeweiligen "active site" Titrationsen (vgl. 4.2.4) herangezogen. Die Elastasen wurden dabei mit einer Eglin-Lösung titriert, deren Konzentration genau bekannt war. Die molare Konzentration des Inhibitors konnte aus den Daten der Aminosäureanalysen berechnet werden. Diese dabei erhaltenen LNPI-Konzentrationen wurden durch Titration einer Chymotrypsin-Lösung, deren aktive Konzentration durch "active site" Titration bestimmt worden war, überprüft. Der Vergleich der Werte der beiden Bestimmungen ergab, daß die Inhibitorpräparationen 60 - 70 % inhibitorisch aktiv waren.

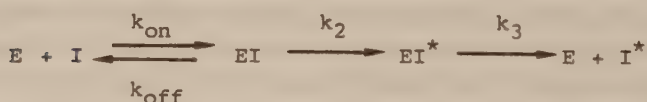
Um die Hemmung der neutralen Serin-Proteinasen durch LNPI zu charakterisieren, wurden zunächst die K_1 -Werte bestimmt. Dabei wurde zuerst angenommen, daß es sich um einen "reversiblen" Inhibitor handeln würde. Bei der Bestimmung der K_1 -Werte aus den Titrationskurven (siehe

Abb. 11) nach Green und Work (43) ergaben sich sehr kleine K_i -Werte (im Bereich von 10^{-10} mol/l; siehe Tabelle 5). Die Werte nach Dixon (44) lagen im Bereich von 10^{-9} mol/l und zeigten damit Abweichungen zu den Werten nach Green und Work. Diese gemessenen Unterschiede in den Dissoziationskonstanten waren ein erster Hinweis dafür, daß es sich möglicherweise nicht um eine reversible Hemmung handeln könnte. Ein weiterer Hinweis, der diese Vermutung bestätigte, war die Tatsache, daß sich bei der Bestimmung des K_i -Wertes nach Dixon Geraden ergaben, die sich alle in einem gemeinsamen Punkt auf der negativen x-Achse schnitten (siehe Abb. 12). Dieses Verhalten wird in der Literatur (4) einem nicht-kompetitiven Hemmechanismus zugeschrieben.

Um den Hemmechanismus näher zu charakterisieren, wurde die Hemmung der Serinproteinasen durch LNPI bei verschiedenen LNPI- und Substrat-Konzentrationen untersucht. Die Darstellung erfolgte in der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver und Burk (42). Wiederum schnitten sich alle Geraden in einem gemeinsamen Punkt auf der negativen x-Achse (siehe Abb. 9) und zeigten das typische Bild einer nicht-kompetitiven Hemmung. Von einer nicht-kompetitiven Hemmung im Sinne der klassischen Enzymkinetik (4) kann aber nur dann gesprochen werden, wenn auch wirklich ein reversibler Inhibitor vorliegt, das heißt ein Inhibitor, der sich von seiner Bindungsstelle wieder abdissoziieren läßt. Die bisher diskutierten Ergebnisse schließen aber einen irreversiblen Hemmechanismus nicht aus; die Titrationskurven deuten sogar eher auf einen irreversiblen Inhibitor hin, da durch steigende Inhibitorkonzentrationen die Enzymaktivität praktisch auf 0 % Restaktivität gesenkt werden kann, während bei einer reversiblen Hemmung auch bei einem hohen Inhibitorüberschuß noch eine Restaktivität nachweisbar bleibt.

Zur Klärung, ob es sich beim LNPI um einen irreversiblen Inhibitor handelt, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt. So konnte gezeigt werden, daß LNPI mit α -Chymotrypsin stabile Komplexe ausbildet, die sogar in Gegenwart von SDS und DTT stabil sind und so in der SDS-PAGE nachgewiesen werden können (siehe Abb. 16). Bei der Umsetzung von Träger-gebundenem, aktivem Chymotrypsin mit LNPI kommt es zu einer Inaktivierung des Inhibitors durch Modifizierung (Abspaltung eines kleineren, ca. 3 kDa großen Peptids; siehe Abb. 15). Dies spricht dafür, daß der Inhibitor an das aktive Zentrum bindet und dort langsam gespalten wird. Das Peptid konnte in der Elektrophorese nur indirekt über das Molekulargewicht des modifizierten Inhibitorproteins nachgewiesen werden. Einem direkten Nachweis entzog es sich auf Grund seiner geringen Größe. Möglicherweise ging es bei der Dialyse der Proben vor der Elektrophorese verloren.

Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint LNPI demnach die neutralen Serin-Proteinasen nach dem gleichen Mechanismus zu hemmen wie α_1 PI (7,8):



LNPI bindet in einer ersten reversiblen Reaktion an das aktive Zentrum der Proteinasen, wobei es zur Ausbildung eines intermediären Enzym-Inhibitor-Komplexes (EI) kommt. In diesem Komplex findet dann die Spaltung des Inhibitors und eine damit verbundene Inaktivierung des Inhibitors statt (EI^*). Der gesamte Inaktivierungsmechanismus (vgl. Schema) stellt sich "nach außen" bei der Bestimmung der kinetischen Konstanten als nicht-kompetitiver Hemmechanismus dar.

Da nach den vorliegenden Daten LNPI in einer ersten reversiblen Reaktion (vgl. Schema) einen Enzym-Inhibitor-Komplex bildet, der in einem weiteren irreversiblen Reaktionsschritt zu einem Komplex aus Enzym und modifizierten Inhibitor weiterreagiert, kann die Hemmung nicht durch K_i -Werte charakterisiert werden. Zur quantitativen Charakterisierung der Hemmung der Serinproteasen durch LNPI wurden aus diesem Grund die k_{on} -Werte bestimmt. Zur Messung der k_{on} -Werte waren empfindliche Substrate notwendig, da mit sehr verdünnten Enzym- und Inhibitor-Lösungen gearbeitet werden mußte. Die ermittelten k_{on} -Werte für die Hemmung der neutralen Serinproteinasen durch LNPI liegen im Bereich von 10^6 l/(mol x s) und damit in der gleichen Größenordnung wie die k_{on} -Werte der Hemmung der entsprechenden Enzyme durch α_1 PI (71, 79). Die hohen k_{on} -Werte zeigen, daß beide Inhibitoren (α_1 PI und LNPI) sehr schnell mit ihren Zielenzymen reagieren und sie effektiv inaktivieren.

Immunologische Untersuchungen

Wie aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen ersichtlich ist, bestehen auffallend viele Ähnlichkeiten zwischen LNPI und α_1 PI, sowohl hinsichtlich der chemischen und physikochemischen Eigenschaften, als auch hinsichtlich der kinetischen Daten und des Hemmechanismus. Signifikante Unterschiede zwischen LNPI und α_1 PI vom Schwein bestehen lediglich in der Molekülmasse und der Ausbildung höhermolekularer Aggregate beim LNPI unter nicht-reduzierenden Bedingungen.

LNPI erwies sich bei der Immunisierung als außergewöhnlich immunogen, d.h. schon nach der zweiten Boosterinjektion war ein hoher Antikörpertiter erreicht.

Mit den isolierten Antikörpern wurden Western-Blot Analysen und Enzymimmunoassays durchgeführt, um die immunologische Kreuzreaktion zwischen LNPI und α_1 PI vom Schwein zu untersuchen. Dabei konnte keine Kreuzreaktion von anti-LNPI Immunglobulin G mit α_1 PI vom Schwein festgestellt werden. Auch im Enzymimmunoassay war eine Kreuzreaktion nicht aufzufinden, weder zwischen anti-LNPI-IgG und α_1 PI noch zwischen anti- α_1 PI Immunglobulin G und LNPI. Es handelt sich demnach um zwei immunologisch verschiedene Proteine. Sollte LNPI jedoch eine weniger glykosilierte, intrazelluläre Form des aus Plasma isolierten α_1 PI darstellen, so könnten möglicherweise die gegen LNPI gerichteten Antikörper die entsprechenden Epitope auf dem α_1 PI nicht erkennen, da diese durch Kohlehydratreste überdeckt wären. Dies würde die negativen Kreuzreaktion trotz der vielen Ähnlichkeiten erklären.

Von den untersuchten Proteinen zeigte der entsprechende Inhibitor aus Rinder-Leukozyten eine schwache Kreuzreaktion mit den Antikörpern gegen LNPI vom Schwein. Die Inhibitoren der beiden Spezies entsprechen sich offensichtlich nicht nur weitgehend in ihren Eigenschaften und in ihrer Funktion, sondern sind auch immunologisch verwandt.

Mit Hilfe des LNPI-Enzymimmunoassays war eine routinemäßige Konzentrationsbestimmung von LNPI in einem Bereich von 0,5 bis 10 ng/ml möglich. Die Wiederfindung von LNPI im Assay lag bei 100 %. Der Intraassay- und der Interassay-Koeffizient lagen in einem Bereich, der für Enzymimmunoassays charakteristisch ist (80).

Mit Hilfe des Enzymimmunoassays für LNPI konnte eine untere Nachweisgrenze von 0,5 ng/ml erreicht werden. Um LNPI noch empfindlicher in wenig Probenmaterial nachweisen zu können, wurde ein Biolumineszenz-verstärkter

Enzymimmunoassay ausgearbeitet. Es war bei diesem empfindlichen Immunoassay-Typ absolut unerlässlich, die Konzentrationen der einzelnen Komponenten genau zu kennen und aufeinander abzustimmen. Dazu wurde der Titer der eingesetzten immunselektierten anti-LNPI-IgG-Lösung mit Pansorbin A^R bestimmt (vgl 5.6.1); die Optimierung der LNPI-Peroxidase-Konjugat-Verdünnung wurde erarbeitet, sowie der Konzentrationsbereich der LNPI-Standardkurve ermittelt. So konnten optimierte Bedingungen gefunden werden, die für die Erstellung der Standardkurve des Biolumineszenz-Enzymimmunoassays ein gut meßbares Lichtsignal zwischen ca. 25 000 imp/10 s und ca. 4000 imp/10 s ergaben.

Die Wiederfindung von LNPI im Biolumineszenz Enzymimmunoassay, der Interassay- und der Intraassay-Koeffizient lagen in den für Enzymimmunoassays typischen Bereichen. Mit Hilfe dieses Assays konnte LNPI auch in solchen Konzentrationsbereichen bestimmt werden, in denen die Empfindlichkeit des herkömmlichen Enzymimmunoassays nicht mehr ausreichte.

Lokalisation des Inhibitors

Mit Hilfe immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß der Inhibitor in den Granulozyten lokalisiert ist. Dies konnte auch für den entsprechenden Inhibitor aus Rinder-Leukozyten gezeigt werden (68). Intrazellulär fanden sich positive Gold-Signale vorallem im Bereich der Granula. Im Cytosol waren nur vereinzelt possitive Signale erkennbar. Dies überrascht, da der Inhibitor nach Fraktionierung der Zellbestandteile aus Cytosol isoliert wurde. Möglicherweise liegt eine schwache Assoziation des Inhibitors an die Granulamembran vor, die im Verlauf der Aufarbeitung der Granulozyten gestört wird, so daß der Inhibitor ins Cytosol freigegeben wird. Die Assoziation des Inhibitors

an die Granulamembran wäre physiologisch durchaus sinnvoll; eventuell aus den Granula freiwerdende neutrale Proteinasen könnten sofort und effektiv durch den Inhibitor an der Granulamembran gehemmt werden. Dadurch würde ein weiteres Vordringen dieser Enzyme verbunden mit der proteolytischen Zerstörung von z. B. Zellstrukturen, cytosolischen Proteinen etc. verhindert.

Physiologische und pathophysiologische Studien

Nach Ausarbeitung der Enzymimmunoassays standen Methoden zur Verfügung, um reproduzierbare Bestimmungen von LNPI rasch und einfach durchführen zu können. So wurden einerseits Messungen des LNPI-Gehaltes in Granulozyten vorgenommen, andererseits wurden LNPI-Konzentrationen in Plasmen von normalen oder septischen Schweinen bestimmt. Desweiteren erfolgten in vitro Stimulationsversuche mit Schweine-Leukozyten in Vollblut oder in Suspensionen gewaschener Leukozyten.

Die Bestimmung des LNPI-Gehalts der Granulozyten ergab, daß $64 \pm 0,6 \times 10^{-15}$ g Inhibitor pro Zelle vorkommen.

Die Konzentration des LNPI im Plasma von gesunden, normalen Schweinen lag bei 130 ± 20 ng/ml. Kam es zu einer Zerstörung der Granulozyten, im Verlauf einer Sepsis, so konnten bis zum 100fachen erhöhte LNPI-Werte in Schweine-Plasmen nachgewiesen werden. Der LNPI-Enzymimmunoassay erfaßte dabei den freien LNPI und den möglicherweise an Enzym gebundenen LNPI. LNPI-Spiegel, die am Sepsis Modell des Schweines gemessen wurden, waren eindeutig mit dem Verlauf der Sepsis korrelierbar. Der LNPI-Gehalt im Plasma ist damit ein Parameter, der vom Schwere-Grad der Sepsis (Desintegration der Leukozyten) abhängt. Wie die Untersuchungen zeigten, eignet sich LNPI sehr gut dazu, den Verlauf einer Sepsis beim Schwein zu verfolgen.

Die Stimulation der Leukozyten verbunden mit einer Desintegration konnte auch in "in vitro" Versuchen durch Bestimmung der LNPI-Freisetzung aus den Leukozyten nachgewiesen werden. Es zeigte sich dabei, daß hinsichtlich der Stimulierung zwischen Schweine- und menschlichen Leukozyten ein Unterschied besteht. Im Gegensatz zu menschlichen Leukozyten, bei denen bereits 30 min nach der Stimulierung eine Desintegration nachgewiesen werden konnte (81), erfolgte die Desintegration von Schweine-Leukozyten, die durch die LNPI-Freisetzung verfolgt wurde, erheblich später (ca. nach 10 bis 12 h). Nur mit Zymosan konnte in den Leukozyten-Suspensionen eine sofortige Desintegration erreicht werden (vgl. Abb. 32).

Zusammenfassende Betrachtungen

Der aus Schweine-Leukozyten isolierte Inhibitor zeigt viele Ähnlichkeiten mit α_1 PI vom Schwein; besonders im Hemmverhalten (Spezifität) und Hemmechanismus, aber auch in der Aminosäurezusammensetzung und in der bisher bekannten Primärstruktur. Dennoch konnte keine immunologische Kreuzreaktion zwischen beiden Proteinen nachgewiesen werden. Ungeklärt bleibt deshalb noch, ob es sich beim LNPI um einen eigenständigen, intrazellulären Inhibitor handelt, der zur Serpin-Familie gehört, oder ob es sich um eine nur im Kohlenhydrat-Anteil modifizierte intrazelluläre Form des α_1 PI handelt.

Die physiologische Funktion des LNPI ist noch nicht endgültig geklärt, doch ist wahrscheinlich, daß LNPI und α_1 PI dieselbe Aufgabe erfüllen, nämlich die Hemmung der neutralen Proteinase bei deren Freisetzung aus den Granula einmal intrazellulär (LNPI) oder extrazellulär (α_1 PI). Die hohe LNPI-Konzentration von 64×10^{-15} g pro Zelle (für humane Leukozyten-Elastase wurde ein Wert von 460×10^{-15} g/Zelle bestimmt (82)) scheint diese

Annahme zu bestätigen. Da die Konzentrationen von LNPI und Leukozyten-Elastase im gleichen Größenordnungsbe-
reich liegen, kann weiter geschlossen werden, daß LNPI
durchaus eine physiologische Rolle als Inhibitor für die
granulozytären Proteinase besitzt. LNPI ist auf Grund
der hohen k_{on} -Werte ein besonders guter Inhibitor.

LNPI ist physiologisch primär intrazellulär wirksam, um
Zellorganellen und cytosolische Proteine vor ungewolltem
proteolytischem Angriff zu schützen. α_1 PI wirkt dagegen
vorwiegend extrazellulär und schützt so die Proteine im
Plasma und Interstitium vor ungewolltem proteolytischem
Abbau. Beide Inhibitoren ergänzen sich so in ihrer
Funktion.

Während einer Sepsis kommt es zur Degranulierung bzw.
Desintegration der Leukozyten wobei die granulozytären
Proteasen, vor allem PMN-Elastase, aber auch LNPI frei-
gesetzt werden. LNPI kann dabei neben α_1 PI als Inhibitor
der neutralen Serin-Proteinase auch extrazellulär wirk-
sam werden.

Wie die Versuche zeigten, kann der Gesamt-LNPI-Gehalt im
Plasma von Schweinen (freier LNPI und Enzym-gebundener
LNPI) als Sepsis-Parameter für den Verlauf einer Sepsis
dienen.

Um zu klären, ob LNPI möglicherweise eine modifizierte, intrazelluläre Form des α_1 PI darstellt, müssen die Sequenzdaten beider Proteine miteinander verglichen werden. Dazu ist zukünftig die Sequenzaufklärung von LNPI aus Leukozyten des Schweins und α_1 PI aus Schweineplasma geplant.

Weiterhin ist von Interesse, ob ein entsprechender Inhibitor auch in menschlichen Granulozyten vorkommt. In ersten vorläufigen Untersuchungen konnte mit Antikörpern gegen LNPI vom Schwein keine Kreuzreaktion mit Proteinen im Cytosol menschlicher Granulozyten gefunden werden. Weitere hemmkinetische Untersuchungen zeigten jedoch, daß ein solcher Inhibitor möglicherweise auch in menschlichen Leukozyten vorkommt.

Da LNPI ein geeigneter Parameter zur Beobachtung des Verlaufs einer Sepsis ist, wird mit Hilfe der entwickelten Enzymimmunoassays für LNPI zukünftig beim Schwein der Sepsisverlauf routinemäßig kontrolliert werden. Der Einsatz von LNPI-Konzentrationsmessungen am Pankreatitis-Modell und bei anderen Tierversuchsmodellen des Schweins ist in Vorbereitung.

Der bisher zur Verfügung stehende Enzymimmunoassay für Gesamt-LNPI (freier LNPI und Enzym-gebundener LNPI) soll durch Ausarbeitung geeigneter Enzymimmunoassay-Varianten verändert werden, so daß neben der Gesamt-LNPI-Konzentration im Plasma auch an PMN-Elastase gebundener LNPI während der Sepsis gemessen werden kann. Anhand dieser kombinierten Immunoassays soll die Beteiligung therapeutisch eingesetzter Inhibitoren wie z.B. Eglin, HUSI I, Hirudin u.a. bei der Hemmung der granulozytären Proteasen neben LNPI und α_1 PI studiert werden.

- (1) H.Neurath und K.A.Walsh (1976), Role of proteolytic enzymes in biological regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 3825-3832.
- (2) H.Holzer und P.C.Heinrich (1980), Control of proteolysis. Ann. Rev. Biochem. 49, 63-91.
- (3) J.P.Vincent und M.Lazdunski (1973), The interaction between a chymotrypsin and pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor). Kinetic and thermodynamic properties. Europ. J. Biochem. 38, 365-372.
- (4) G.Michal (1984), Determination of michaelis constants and inhibitor constants. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 1 (H.U.Bergmeyer, J.Bergmeyer und M.Gaßl eds.) pp. 86 - 104, Verlag Chemie, Weinheim.
- (5) H.Heidtmann und J.Travis (1986), Human α_1 -proteinase inhibitor. In: Proteinase Inhibitors (Barett und Salvesen eds.), pp. 441 - 456, Elsevier Science Publishers BV.
- (6) D.Vercaigne-Marko, M.Davril, A.Laine und A.Hayem (1985), Interaction of human α_1 -proteinase inhibitor with human leukocyte cathepsin G. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 366, 655-661.
- (7) M.Laskowski Jr. und I.Kato (1980), Protein Inhibitors of Proteinases. Ann. Rev. Biochem. 49, 593-626.

- (8) K.Beatty, N.Matheson und J.Travis (1984), Kinetic and chemical evidence for the inability of oxidized α_1 -proteinase inhibitor to protect lung elastin from elastolytic degradation. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 365, 731-736.
- (9) J.Travis und G.S.Salvesen (1983), Human Plasma Proteinase Inhibitors, Ann Rev. Biochem. 52, 655-709.
- (10) H.Tschesche, J.Beckmann, A.Mehlich, E.Schnabel, E.Truscheidt und H.R.Wenzel (1987), Semisynthetic engineering of proteinase inhibitor homologues. Biochim. Biophys. Acta 913, 97-101.
- (11) E.W.Davie, K.Fujikawa, K.Kurachi und W.Kisiel (1979), The role of serine proteinases in blood coagulation. Adv. Enzymol. 48, 277-318.
- (12) B.Wiman und D.Collen (1978), Molecular mechanisms of physiological fibrinolysis. Nature 272, 549-550.
- (13) K.B.M.Reid und R.R.Porter (1981), The proteolytic activation systems of complement. Ann. Rev. Biochem. 50, 433-464.
- (14) R.Geiger (1981), The kallikrein-kinin systems. In: Proteinases and their inhibitors, (V.Turk und L.Vitale eds.), pp. 353-376, Pergamon Press, Oxford.
- (15) M.Jochum und H.Fritz (1985), Granulozytäre Elastase als Marker der unspezifischen Proteolyse in der Phatogenese entzündlicher Erkrankungen. In: Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik, (M.Jochum, F.Gabl, H.Greiling und H.Fritz, eds.), 1-8, GIT Verlag Darmstadt.

(16) A.Janoff, J.Blondin, R.A. Sandhaus, A.Mosser und C.Malmud (1975). In: Proteinases and Biological Control (E.Reich, D.B.Rifkin und E.Shaw, eds.), 603-627, Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

(17) H.Fritz, H.Schiessler, R.Geiger, K.Ohlsson und K. Hochstraßer (1978), Naturally occurring low molecular weight inhibitors of neutral proteinases from PMN-granulocytes and of kallikrein. Agents and Actions 8, 57-64.

(18) A. Janoff (1972), Human granulocyte elastase. Am. J. Pathol. 68, 579-592.

(19) S.Neumann, G.Gunzer, N.Heinrich und H.Lang (1985), Enzymimmunoassay für Granulozyten-Elastase im Komplex mit α_1 -Proteinaseinhibitor. In: Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik, (M.Jochum, F.Gabl, H.Greiling und H.Fritz, eds.), 9-16, GIT Verlag Darmstadt.

(20) K.H. Duswald, M.Jochum und H.Fritz (1982), New findings in the pathophysiology and pathobiochemistry of sepsis and septic shock: the importance of proteinase realase and the possibilities for treatment. Intense Care News 2, 1-6, Excerpta medica, Amsterdam.

(21) M.Kopitar und D.Lebez (1975), Intracellular distribution of neutral proteinases and inhibitors in pig leukocytes. Eur.J. Biochem. 56, 571-581.

(22) A.Dubin (1976), A polyvalent proteinase inhibitor from horse-blood-leukocyte cytosol. Eur. J. Biochem. 73, 429-435.

(23) F.S.Steven, D.W.Milsom und A.A.Hunter (1976), Human polymorphonuclear leucocyte neutral protease and its inhibitor. Eur. J. Biochem. 67, 165-169.

(24) A.Böyum (1968), Isolation of leucocytes from human blood; further observations. Scand. J. Clin. Lab. Invest, Supplement 97, 31-50.

(25) U.K.Laemmli (1970), Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

(26) B.R.Oakley, D.R.Kirsch und N.P.Morris (1980), A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105, 361-363.

(27) A.E.Eckhardt, C.E.Hayes und I.J.Goldstein (1976), A sensitive fluorescent method for the detection of glycoproteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 73, 192-197.

(28) A.Görg, G.A. Postel und R.Westermeier (1978), Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on celluphane. Anal.Biochem. 89, 60-70.

(29) E.G. DelMar, C.Largman, J.W.Brodrick und M.C.Geokas (1979), A sensitive new substrate for chymotrypsin. Anal. Biochem.99, 316-320.

(30) R.Geiger (1984), Chymotrypsin. In: Methods of Enzymatic Analysis, Vol. 5 (H.U.Bergmeyer, J.Bergmeyer und M.Gaßl eds.) pp. 99-109, Verlag Chemie Weinheim.

(31) K.A.Walsh (1970), Trypsinogens and trypsin of various species. *Meth. Enzymol.*19, 41-63.

(32) R.Geiger und H.Fritz (1984), Trypsin. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 5 (H.U.Bergmeyer, J.Bergmeyer und M.Gaßl eds.) pp. 119-129, Verlag Chemie, Weinheim.

(33) M.J.Castillo, K.Nakajima, M.Zimmerman und J.C.Powers (1979), Sensitive substrates for human leukocyte and porcine pancreatic elastase: A study of the merits of various chromophoric and fluorogenic leaving groups in assays for serine proteases. *Anal. Biochem.*99, 53-64.

(34) K.Nakajima, I.C.Powers, M.J.Castillo, B.M.Ashe und M.Zimmermann (1979), Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. *J. Biol. Chem.*254, 4027-4031.

(35) A.J.Barrett (1972), A New Assay for Cathepsin B1 and other Thiol Proteinases. *Anal. Biochem.* 47, 280-293.

(36) I.Trautschold und E.Werle (1961), Spektrophotometrische Bestimmung des Kallikreins und seiner Inaktivatoren. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*325, 48-59.

(37) H.Fritz, I.Eckert und E.Werle (1967), Isolierung und Charakterisierung von sialinsäurehaltigem und sialinsäurefreiem Kallikrein aus Schweinepankreas. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*3481, 1120-1132.

(38) P.Friberger, E.Eriksson, S.Gustavsson und G.Clasen (1979), Determination of prekallikrein in plasma by means of a chromogenic tripeptide substrate for plasma kallikrein. *Adv. Exp. Med. Biol.* 120A, 67-82.

- (39) F.J.Kezdy und E.T.Kaiser (1970), Principles of active site titration of proteolytic enzymes. Meth. Enzymol.19, 3-20.
- (40) T.Chase und E.Shaw (1970), Titration of trypsin, plasmin and thrombin with p-Nitrophenyl p'-Guanidinobenzoat HCl. Meth. Enzymol.19, 20-27.
- (41) U.Seemüller, M.Meier, K.Ohlsson, H.P. Müller und H.Fritz (1977), Isolation and characterisation of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1105-1117.
- (42) H.Lineweaver und D.Burk (1934), Determination of Enzyme Dissociation Constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666.
- (43) N.M.Green u. E.Work (1952), Pancreatic trypsin inhibitor. Biochem. J. 54, 347-352.
- (44) M.Dixon (1953), The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170-171.
- (45) W.Miska und R.Geiger (1986), persönliche Mitteilung
- (46) J.W.Harper, G.Ramirez und J.C.Powers (1981), Reaction of peptide thiobenzyl esters with mammalian chymotrypsinlike enzymes: A sensitive assay method. Anal. Biochem.118, 382-387.
- (47) H.Ako, R.J.Foster und C.A.Ryan (1972), The preparation of anhydro-trypsin and its reactivity with naturally occurring proteinase inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 1402-1407.

(48) H.Ako, R.J.Foster und C.A.Ryan (1974), Mechanism of action of naturally occurring proteinase inhibitors. Studies with anhydro-trypsin and anhydro-chymotrypsin purified affinity chromatographie. Biochem. 13, 132-137.

(49) P.Böhlen und R.Schroeder (1982), High sensitive amino acid analysis: Methodology for the determination of amino acid composition with less than 100 picomoles of peptides. Anal. Biochem. 126, 144-152.

(50) D.R.Grassetti und J.F.Murray (1967), Determination of sulfhydryl groups with 2,2'- or 4,4'- dithiodidydri-dine. Arch. Biochem. Biophys.119, 41-49.

(51) A.M.Crestfield, S.Moor und W.H.Stein (1963), The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced S-Carboxymethylated proteins. J. Biol. Chem. 238, 622-627.

(52) P.Edman (1970), Sequence determination. In: Protein Sequence Determination (Needleman,S.B. ed.) 2nd edn., 211-255, Springer Verlag, Berlin.

(53) F.Lottspeich (1980), Identification of the phenyl-thiohydantoin derivates of amino acids by high pressure liquid chromatographie, using a ternary, isocratic solvent system. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829-1834.

(54) F.Lottspeich, R.Geiger, A.Henschen und C.Kutzbach (1979), N-Terminal amino acid sequence of human urinary kallikrein. Homology with other serine proteases. Hoppe-Seyler' Z. Physiol. Chem. 360, 1947-1950.

(55) F.Lottspeich, J.Kellermann, A.Henschen, B.Foertsch und W.Müller-Esterl (1985), The amino acid sequence of the light chain of human high-molecular-mass kininogen. Eur. J. Biochem. 152, 307-314.

(56) M.M.Bradford (1976), A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

(57) M.Steinbuch und M.Audran (1969), The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of captylic acid. Arch. Biochem. Biophys.134, 279-284.

(58) C.B. Laurell (1966), Quantitativ estimation of proteins by elektrophoresis in agarose gel containing antibodies, Anal.Biochem..15, 45-54.

(59) H.Towbin, T.Staehelin u. J.Gordon (1979), Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350- 4354.

(60) M.Moeremans, G.Danells u. J.de Mey (1985), Sensitiv colloidal metal (gold or silver) staining of protein blots on nitrocellulose membranes. Anal. Biochem. 145, 315-321.

(61) A.Voller, D.Bidwell u. A.Barlett (1979). In: "The Enzymlinked Immunosorbent Assay" Dynatech, Guernsey, GB, p.40

(62) M.B. Wilson u. P.K. Nakane (1978). In: "Immunofluorescence and related Technics" (K.Holubar u. G.Wick eds.), Elsevier-North Holland, Biomedical Press, Amsterdam, pp. 215-244.

(63) J.Carlsson, H.Drevin u. R.Axen (1978), Protein thiolation and reversible protein-protein conjugation. N-Succinimidyl-3-(2-pyridithio)-propionat, a new hetero-bifunctional agent. Biochem. J. 173, 723-737.

(64) W.Miska (1986), Dissertation, Fakultät für Chemie und Pharmacie der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

(65) J.Roth, M.Bendayan und L.Orci (1978), Ultrastructural localization of intracellular antigens by the use of protein A-gold complex. J. Histochem. Cytochem. 26, 1074-1081.

(66) M.Jochum, H.Welter, H.Wiesinger, M.Siebeck, O.Thetter und H.Fritz (1985), Erste Erfahrungen mit einem klonierten Hemmstoff für lysosomale Elastase und Cathepsin G, dem sog. Eglin des Medizinischen Blutegels beim septischen Schock des Schweins. Langenbecks Arch. Chir. (Suppl.) Forum '85, 43-47.

(67) K.Beatty, J.Bieth und J.Travis (1980), Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized α_1 -proteinase inhibitor. J. Biol. Chem. 255, 3931-3934.

(68) P.Hintz, M.Jochum und H.Mossmann (1987), Neutral proteinase inhibitors in PMN-Leukocytes, Part 1: Purification and characterisation of a neutral proteinase inhibitor from bovine polymorphonuclear neutrophils. Hoppe Seyler' Z. Physiol. Chem. in press.

(69) D.Johnson und J.Travis (1979), The oxidative inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor. Further evidence for methionin at the reactive center. J. Biol. Chem. 254, 4022-4026.

(70) R.F.Doolittle (1977), Sequencing peptides and proteins lacking free α -amino groups; in *Advanced Methods in Protein Sequence Determination* (S.B.Needleman ed.), Springer Verlag 1977, 38 - 54.

(71) R.Geiger, G.Leysath und H.Fritz (1985), Isolation and characterisation of porcine α_1 -proteinase inhibitor, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 23, 637-643.

(72) J.O.Jeppsson, C.B.Laurell und M.Fayerhol (1978), Properties of isolated human α_1 -antitrypsin of P_i types M, S and Z. *Eur. J. Biochem.* 83, 143-153.

(73) M.Jochum, J.Witte, H.Schiessler, H.V.Selbmann, H.Ruckdeschl und H.Fritz (1981), Clotting and other plasma factors in experimental endotoxemia: inhibition of degradation by exogenous proteinase inhibitors. *Eur. Surg. Res.* 13, 152-168.

(74) J.J.Tobin und C.S.Hutchinson (1982), An overview of the pulmonary features of a α_1 -Antitrypsin deficiency. *Arch. Intern. Med.* 142, 1342-1348.

(75) K.Kurachi, T.Chandra, S.J.Friezner Degen, T.T.White, T.L.Marchioro, S.L.C.Woo und E.W.Davie (1981), Cloning and sequence of cDNA coding for α_1 -antitrypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6826-6830.

(76) T.E.Petersen, G.Dudek-Wojciechowska, N.Sottrup-Jensen und S.Magnusson (1979). In: *The physiological inhibitors of blood, coagulation and fibrinolysis*, (W.Collen, H.Wiman und M.Verstraete eds.), pp. 43, Elsevier, North-Holland, Amsterdam.

(77) L. McReynolds, B.W. O'Malley, A.D. Nisbet, J.E. Fothergill, D. Givol, S. Field, M. Robertson und G. Brownlee (1978), Sequence of chicken ovalbumin mRNA. *Nature* 273, 723-728.

(78) L.T. Hunt und M.O. Dayhoff (1980), A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin III and α_1 -proteinase inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95, 864-871.

(79) J. Travis, N. Matheson, P.M. George und R.W. Carrell (1986), Kinetic studies on the interaction of α_1 -proteinase inhibitor (Pittsburgh) with trypsin-like serine proteinases. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 367, 853-859.

(80) A.H.W.M. Schuurs und B.K. van Weemen (1976), Prinzip des heterogenen Enzymimmunoassays (EIA oder ELISA). In: *Enzymimmunoassay*, (W. Vogt ed.), pp. 4-9, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

(81) M. Jochum und A. Dwenger (1986), Sequential release of lysosomal inflammation mediators and chemiluminescence response of stimulated polymorphonuclear leukocytes. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 324, 362-363.

(82) E.F. Plow (1982), Leukocyte elastase release during blood coagulation. *J. Clin. Invest.* 69, 564-572.

Abkürzungen

A, mA	Ampere, milli-Ampere
ABTS	2,2'-Azido-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonat(6)
AcPheArgOEt	N ^α -Acetyl-L-phenylalanyl-L-argininethylester
ADH	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosin-5'triphosphat
BEIA	Biolumineszenz-Enzymimmunoassay
BPTI	Bovine pancreatic trypsin inhibitor
BSA	Bovine serum albumin
BzArgNan	N ^α -Benzoyl-L-arginin-nitroanilid
BzArgNA	N ^α -Benzoyl-L-arginin- β -naphthylamid
CNBr	Bromcyan
DProPheArgNan	D-Prolyl-L-phenylalanyl-L-arginin-nitroanilid
DEA	Diethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
	Molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure
EGTA	1,2-Bis-(2-aminoethoxyethan)-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FPLC	Fast protein liquid chromatography
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	High pressure liquid chromatography
IgG	Immunglobulin Fraktion G
imp	Lichtimpulse
IU	Inhibitor-Unit
mIU	milli-Inhibitor-Unit
kDa	kilo-Dalton
K _i	Dissoziationskonstante
K _M	Michaelis-Menten-Konstante

k_{off}	Dissoziationsgeschwindigkeits-Konstante
k_{on}	Assoziationsgeschwindigkeits-Konstante
l	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
LNPI	Leukocyte neutral proteinase inhibitor
MeOSuc(Ala) ₂ ProValNan	N^{α} -Methoxysuccinyl-(L-alanyl) ₂ -L-prolyl-L-valin-nitroanilid
MeOSuc(Ala) ₂ ProValAMC	N^{α} -Methoxysuccinyl-(L-alanyl) ₂ -L-prolyl-L-valin-amino-4-methyl-coumarin
NAD	Nikotinamid-adenin-dinukleotid
NPGb	4-Nitrophenyl-4'-guanidinobenzoat-hydrochlorid
PBS	Phosphat-buffered saline
pI	Isoelektrischer Punkt
α_1 PI	α_1 -Proteinase-Inhibitor
PMN	Polymorphonuclear
PTH	Phenylthiohydantoin
RFU	Relative Fluoreszenz-Einheiten
s	Sekunde
SERPINE	Serinproteinase-Inhibitoren
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
SPDP	N-Succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)propionate
Suc(Ala) ₂ ProPheNan	N^{α} -Succinyl-(L-alanyl) ₂ -L-prolyl-L-phenylalanin-nitroanilid
Suc(Ala) ₂ ProPheSBzl	N^{α} -Succinyl-(L-alanyl) ₂ -L-prolyl-L-phenylalanin-S-benzylester
TPCK	N^{α} -Tosyl-L-phenylalanyl-chlormethylketon
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Umsatz von 1 μmol Substrat/min)
mU	milli-Unit
V	Volt

Danksagungen

Herrn Professor Dr. H. Fritz möchte ich für die Möglichkeit danken, die vorliegende Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Herrn Priv. Doz. Dr. R. Geiger danke ich für die Bereitstellung des Themas. Bei der Durchführung der Arbeit stand er mir ständig mit seiner ganzen fachlichen Erfahrung motivierend zur Seite.

Für fachliche und methodische Hilfestellungen darf ich mich bedanken bei: Frau Hauzenberger, Frau Lamers, Frau Arnhold, Frau Sokal, Frau Hauber, Herrn Dr. Miska, Herrn Nettelbeck, Herrn Professor Dr. Fink und Herrn Priv. Doz. Dr. Müller-Esterl.

Für die Durchführung der Sequenz-Analysen möchte ich mich bei Herrn Dr. F. Lottspeich und Herrn Dr. J. Kellermann, MPI für Biochemie, Martinsried bedanken.

Frau Dr. Zeck-Kapp, Pathologisches Institut der Universität Freiburg danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herrn Dr. Siebeck und Herrn Dr. Hoffmann danke ich für die Durchführung der tierexperimentellen Studien am Sepsis Modell des Schweins.

Lebenslauf

- 09.09.1957 Geboren als Sohn von Gustav Trefz und Irma, geb. Müller in Backnang.
- 1963 - 1967 Besuch der Grundschule in Großaspach
- 1967 - 1976 Max Born Gymnasium Backnang, Abitur: Juni 1976.
- 1976 - 1977 Grundwehrdienst.
- 1977- 1984 Studium der Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Vordiplom: November 1979; Haupt-Diplom: Juli 1984.
- 1984 - 1987 Dissertation unter Leitung von Priv. Doz. Dr. R. Geiger an der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München (Leitung: Prof. Dr. H. Fritz).

